

Philipps



Universität
Marburg

Kernimport des TEAD-Transkriptionsfaktors Tec1 aus *Saccharomyces cerevisiae*

Dissertation

zur

Erlangung des Doktorgrades

der Naturwissenschaften

(Dr. rer. nat.)

dem

Fachbereich Biologie

der Philipps-Universität Marburg

vorgelegt von

Sandra Kern

aus Kassel

Marburg/Lahn 2011

Die vorliegende Arbeit wurde von Januar 2007 bis April 2011 in der Arbeitsgruppe von Herrn Prof. Dr. Hans-Ulrich Mösch am Fachbereich Biologie im Institut für Genetik der Philipps-Universität Marburg angefertigt.

Vom Fachbereich Biologie
der Philipps-Universität Marburg als Dissertation am 02.06.2011 angenommen.

Erstgutachter: Prof. Dr. Hans-Ulrich Mösch
Zweitgutachter: Prof. Dr. Uwe Maier

Tag der mündlichen Prüfung am: 21.06.2011

Teile dieser Arbeit wurden in folgendem Artikel veröffentlicht:

Heise, B., van der Felden, J., Kern, S., Malcher, M., Brückner, S., and Mösch, H.U. (2010). The TEA transcription factor Tec1 confers promoter-specific gene regulation by Ste12-dependent and -independent mechanisms. *Eukaryot Cell* **9**, 514-531.

In Bearbeitung:

Kern, S., Wittkowski, K., and Mösch, H.U. (2011) Multiple mechanisms mediate nuclear import of the TEAD transcription factor Tec1 in *Saccharomyces cerevisiae*.

Weitere wissenschaftliche Beiträge:

Brückner, S., Kern, S., Birke, R., and Mösch, H.U. (2011) The TEA transcription factor Tec1 links MAPK and TOR pathways to coordinate yeast development.
(eingereicht)

Schläft ein Lied in allen Dingen,
die da träumen fort und fort,
und die Welt hebt an zu singen,
triffst du nur das Zauberwort.

Joseph von Eichendorff

Inhaltsverzeichnis

Zusammenfassung	1
Summary	2
1. Einleitung	3
1.1 Der Modellorganismus <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	3
1.2 Nukleozytoplasmatischer Transport	5
1.2.1 Überblick über den Kerntransport	5
1.2.2 Kernporenkomplexe – die Orte des Geschehens	6
1.2.3 Karyopherine – Transportrezeptoren zwischen Zytoplasma und Zellkern	9
1.2.4 Lokalisierungssignale – molekulare Adressen für Kernimport und Kernexport	16
1.2.5 Kerntransportzyklus und Mechanismus der Translokation	18
1.2.6 Regulation des Kerntransportes	24
1.3 Tec1 - Struktur und Funktion	25
1.3.1 Die TEAD-Familie der Transkriptionsfaktoren	25
1.3.2 Die Funktionen von Tec1 in <i>S. cerevisiae</i>	28
1.3.3 Die Domänenstruktur von Tec1	29
1.4 Ziele dieser Arbeit	30
2. Ergebnisse	31
2.1 Identifizierung und Charakterisierung der Kernlokalisierungssignale von Tec1	31
2.1.1 Tec1 enthält eine Sequenz, die einer bekannten NLS sehr ähnlich ist, die jedoch nicht hinreichend für die Kernlokalisierung ist	31
2.1.2. Der Transkriptionsfaktor Tec1 enthält zwei Bereiche, die Kernlokalisierung vermitteln	34
2.1.3. Die Kernlokalisierung von Tec1 hängt nicht von Ste12, Kss1, Fus3 oder Nis1 ab	40
2.1.4. Mehrere Aminosäuren sind sowohl für die NLS1-vermittelte Kernlokalisierung als auch für die TCS-Bindung von Tec1 entscheidend	42
2.1.5. Die Aminosäuren K318 und R319 sind für die Funktion der NLS2 entscheidend	51
2.1.6. In Tec1 wirken NLS1 und NLS2 kumulativ auf die Kernlokalisierung des Proteins	53
2.1.7. Die beiden NLS-enhaltenden Fragmente von Tec1 verhalten sich unterschiedlich nach Hemmung des rezeptorvermittelten Kerntransportes	56
2.1.8. Die NLS2 von Tec1 vermittelt rezeptorabhängigen Kernimport	58

2.2 Identifizierung der für den Kerntransport von Tec1 verantwortlichen Karyopherine	61
2.2.1. Das Fehlen eines einzelnen Karyopherins verhindert die Kernlokalisierung der GFP-Tec1-Fragmente nicht	61
2.2.2 MBP-Tec1 interagiert in vitro mit verschiedenen Importinen	67
2.2.3 Die beiden NLSs von Tec1 unterscheiden sich in ihren Importin-Interaktionspartnern	70
2.2.4 Die Interaktion von MBP-Tec1 mit dem Importin Pse1 wird durch Zugabe von RanGTP verhindert	72
2.2.5 MBP-Tec1 zeigt keine Interaktion mit dem Transportin Msn5, bzw. den Exportinen Cse1 und Crm1 in Gegenwart von Gsp1GTP	73
2.3 GFP-Tec1 lokalisiert teilweise in perinukleären Foci, deren Art und Funktion unklar bleibt	75
3. Diskussion	78
3.1 Die Sekundärstruktur der „novel NLS“ ist vermutlich für die Funktion wichtig	78
3.2 Der Transkriptionsfaktor Tec1 enthält zwei funktionelle Kernlokalisierungssignale	80
3.2.1 NLS1 und NLS2 von Tec1 sind unterschiedlich effizient	80
3.2.2 Die NLS1 von Tec1 überlappt mit der TEA-Domäne	82
3.2.2.1 Die DNA-Bindedomäne könnte generell eine Rolle beim Kerntransport von TEAD-Transkriptionsfaktoren spielen.	82
3.2.2.2 Mehrere Aminosäuren sind kritisch für die NLS1-vermittelte Kernlokalisierung	84
3.2.2.3 Mehrere Aminosäuren sind kritisch für die Bindung von Tec1 an TCS-Elemente in vitro und die Transkriptionsaktivierung in vivo	87
3.2.2.4 Mehrere Aminosäuren in der TEA-Domäne von Tec1 sind sowohl für die Kernlokalisierung als auch die TCS-Bindung entscheidend	90
3.2.2.5 Die DNA-Bindedomäne „verankert“ Tec1 im Zellkern durch Bindung an die DNA	93
3.2.3 Die NLS2 von Tec1 überlappt mit der Ste12-Bindedomäne	94
3.2.3.1 Die NLS2 von Tec1 stellt vermutlich ein strukturelles Lokalisierungssignal dar, bei dem zwei basische Reste kritisch sind	94
3.2.3.2 Die Aminosäurereste K318 und R319 sind nicht für die Transkriptionsaktivierung durch Tec1 kritisch	95
3.2.3.3 Der Kerntransport mittels NLS2 ist nicht von Ste12 abhängig	96
3.2.3.4 Die NLS2 von Tec1 vermittelt rezeptorabhängigen Kernimport	96
3.2.4 Die zwei NLSs in Tec1 ermöglichen effizienten Kerntransport	97
3.3. Der Kerntransport von Tec1 erfolgt über mehrere Importine mit teilweise redundanter Funktion	99
3.3.1 Die Importine Mtr10, Kap104, Pse1, Kap95, Srp1, Kap114 und Kap120 vermitteln den Kernimport von Tec1	99
3.3.2 Wie unterscheiden die Importine zwischen NLS1 und NLS2?	101
3.3.3 Der Kernimport über verschiedene Importine ist vorteilhaft	102
3.4 Modell für den Kernimport von Tec1	103

3.5 Es gibt bisher keine Hinweise darauf, dass die Kernlokalisierung von Tec1 reguliert ist _____	106
3.6 Tec1 bzw. Tec1-Fragmente lokalisieren teilweise in perinukleären Foci, deren Funktion unklar bleibt _____	108
3.7 Ausblick _____	109
4. Material _____	110
4.1 Geräte _____	110
4.2 Chemikalien _____	111
4.3 Enzyme, Größenstandards und Kits _____	111
4.4 Auftragsarbeiten _____	111
4.5 Verwendete Antikörper _____	112
4.6 Verwendete Stämme und Plasmide _____	112
4.6.1 <i>Escherichia coli</i> -Stämme _____	112
4.6.2 <i>Saccharomyces cerevisiae</i> -Stämme _____	113
4.6.3 Plasmide _____	114
4.7 Verwendete Oligonukleotide _____	119
5. Methoden _____	123
5.1 Kultivierung von Mikroorganismen _____	123
5.1.1 Kultivierung von <i>Escherichia coli</i> _____	123
5.1.2 Kultivierung von <i>Saccharomyces cerevisiae</i> _____	123
5.2 Isolierung von Nukleinsäuren _____	123
5.2.1 Isolierung von genomischer DNA aus <i>S. cerevisiae</i> _____	123
5.2.2 Isolierung von Plasmid-DNA aus <i>E. coli</i> _____	124
5.2.3 Isolierung von Plasmiden aus <i>S. cerevisiae</i> _____	124
5.3 Klonierungstechniken und Mutagenese von DNA _____	125
5.3.1 Polymerase-Kettenreaktion _____	125
5.3.2 Enzymatische Spaltung von DNA mit Hilfe von Restriktionsendonukleasen _____	125
5.3.3 Gelelektrophorese von DNA in Agarosegelen _____	125
5.3.4 Isolierung von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen _____	126
5.3.5 Ligation von DNA-Fragmenten in Vektoren _____	126
5.3.6 Sequenzspezifische Punktmutagenese _____	126
5.3.7 Fällung von DNA mit Ethanol _____	126
5.4 Transformationsmethoden _____	127
5.4.1 Transformation von <i>S. cerevisiae</i> _____	127
5.4.2 Transformation von <i>E. coli</i> _____	127
5.4.2.1 Herstellung chemisch kompetenter <i>E. coli</i> -Zellen _____	127
5.4.2.2 Transformation von <i>E. coli</i> _____	128

5.5 Analyse von Proteinen	128
5.5.1 Herstellung von Proteinextrakten aus <i>S. cerevisiae</i>	128
5.5.1.1 „Rapid protein extraction from yeast“	128
5.5.1.2 „Alkalische Lyse“	128
5.5.2 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese	128
5.5.3 Immunchemische Detektion von Proteinen auf Nitrocellulose-Membranen	129
5.5.4 Quantifizierung von Immunoblot-Signalen	129
5.5.5 Coomassiefärbung von SDS-Gelen	130
5.5.6 Silberfärbung	130
5.5.7 Photometrischer β -Galaktosidasetest	130
5.6 Reinigung von Proteinen aus <i>E. coli</i>	131
5.6.1 Heterologe Expression und Affinitätschromatographie von Tec1	131
5.6.2 Heterologe Expression und Affinitätschromatographie von Karyopherinen mit GST-Tag	132
5.6.3 Heterologe Expression und Affinitätschromatographie von 6xHis-Gsp1 ^{Q71L}	133
5.6.4 Beladung von His ₆ -Gsp1 ^{Q71L} mit GTP	134
5.7 In vitro Interaktionstest von Proteinen	134
5.7.1 Variante 1 – mit Amylose Resin	134
5.7.2 Variante 2 – mit Glutathion-Sepharose	135
5.8 In vitro Interaktionstest von Proteinen mit DNA – Elektrophoretischer Mobilitäts-Shift-Assay (EMSA)	135
5.8.1 Expression von MBP-TEC1-FLAG in <i>E. coli</i>	135
5.8.2 Herstellung von Proteinextrakten aus <i>E. coli</i>	136
5.8.3 Gelretardierungsexperiment (EMSA)	136
5.9 Mikroskopie	137
5.9.1 Fluoreszenzmikroskopie	137
5.9.2 „Fluorescence Recovery after Photobleaching“ (FRAP)	138
5.10 Tropftest	139
5.11 Statistik	139
5.11.1 Korrelationskoeffizient nach Pearson	139
6. Literatur	140
7. Abkürzungen	158
8. Danksagung	159
9. Erklärung	160
10. Lebenslauf	161

Zusammenfassung

Über den Kerntransport von Transkriptionsfaktoren der TEAD-Familie sind bisher noch keine Untersuchungen gemacht worden. In dieser Arbeit wurde der Kernimport von Tec1, dem einzigen TEAD-Protein aus *Saccharomyces cerevisiae*, detailliert untersucht. In *S. cerevisiae* erfüllt Tec1 vielfältige Funktionen bei der Steuerung der Zellteilung und der Zelldifferenzierung.

In dieser Studie wurden zwei Bereiche des Proteins identifiziert, NLS1 und NLS2 (NLS für nuclear localization signal, Kernlokalisierungssignal), die notwendig und hinreichend für die Kernlokalisierung von Tec1 sind. NLS1 liegt in der N-terminalen Hälfte des Proteins und überlappt vollständig mit der TEA-Domäne, welche DNA-Bindung vermittelt. Es konnte gezeigt werden, dass mehrere Aminosäuren für die Funktion der NLS1 kritisch sind und die meisten dieser Reste auch gleichzeitig bei der Bindung an TCS-Elemente (TCS für TEA consensus sequence) in der DNA eine wichtige Rolle spielen. In einem Strukturmodell liegen diese Reste in einer gemeinsamen Ebene, die folglich sowohl die Kontaktstelle für die Bindung an die DNA als auch vermutlich an Importine darstellt. Drei Aminosäuren wurden identifiziert, deren Seitenketten nicht die für die DNA-Bindung entscheidend sind, deren Mutation jedoch zu einer geringeren Kernimporteffizienz führt. Demzufolge können die Funktionen DNA-Bindung und Kernlokalisierung zumindest teilweise getrennt werden. NLS2 liegt in der C-terminalen Hälfte von Tec1 und entspricht einem Bereich, der auch für die Interaktion mit anderen Proteinen, z. B. dem Transkriptionsfaktor Ste12, notwendig ist. Es konnte aber gezeigt werden, dass in Abwesenheit von Ste12 der Kernimport von Tec1 über die NLS2 nicht beeinträchtigt ist. In der NLS2 wurden zwei benachbarte basische Reste, Lysin 318 und Arginin 319, als kritisch für die Funktion identifiziert.

Weitere genetische und zellbiologische Untersuchungen ergaben, dass beide NLS-Bereiche für einen optimalen Kernimport benötigt werden. Biochemische Bindestudien ergaben zudem, dass beide NLSs mit mehreren Importinen interagieren können, wobei drei Importine beide Lokalisierungssignale erkennen, während vier Importine spezifisch für NLS1 bzw. NLS2 sind. Für Tec1 ergeben sich den Ergebnissen dieser Arbeit zufolge zahlreiche Import-möglichkeiten, da es zwei NLSs enthält, die jeweils von mehreren Importinen gebunden werden können. Dies lässt darauf schließen, dass der Kernimport von Tec1 unter verschiedenen Bedingungen sichergestellt wird, unter denen dieser TEAD-Transkriptions-faktor seine vielfältigen Funktionen wahrnehmen kann.

Summary

Nuclear transport of the TEAD-family transcription factors has not been studied so far. In this work, nuclear import of Tec1, the only TEAD-protein from *Saccharomyces cerevisiae*, has been investigated in detail. In *S. cerevisiae*, Tec1 fulfills versatile functions by controlling cell division and cell differentiation.

The study revealed that two regions of the protein, NLS1 and NLS2 (NLS for nuclear localization signal), are necessary and sufficient for nuclear localization of Tec1. NLS1 lies in the N-terminal half of the protein and overlaps completely with the TEA-domain which confers DNA-binding. Several amino acids were identified to be critical for the function of NLS1 and that most of these residues are also important for binding to TCS-elements (TCS for TEA consensus sequence) in the DNA. In a structural model, these residues are arranged in the same plane, indicating that this area serves as the contact site for DNA-binding as well as probably for importins. Three amino acids have been identified, whose side chains are not crucial for DNA-binding, but mutation of these residues leads to a decreased efficiency of nuclear import. Therefore, the functions DNA-binding and nuclear localization can be separated at least partially. NLS2 is in the C-terminal half of Tec1 and corresponds to a region which is necessary for interactions with other proteins, for example the transcription factor Ste12. It could be shown that nuclear import of Tec1 is not affected in the absence of Ste12. In NLS2 two adjacent residues, lysine 318 and arginine 319, have been identified to be crucial for its function.

Further genetic and cell biological analyses showed that both NLS-regions are required for optimal nuclear import. Biochemical binding assays revealed that both NLSs can interact with several importins. Three of them can recognize both localization signals, whereas four importins are specific for NLS1 or NLS2. According to the results of this work, there are numerous ways for Tec1 nuclear import, because it contains two NLSs which interact with several importins each. This leads to the conclusion that nuclear import of Tec1 is ensured under different conditions so that this TEAD-transcription factor can fulfill its versatile functions.

1. Einleitung

1.1 Der Modellorganismus *Saccharomyces cerevisiae*

Die Bäckerhefe *Saccharomyces cerevisiae* ist ein eukaryotischer Mikroorganismus und gehört phylogenetisch in das Reich der Pilze und in die Klasse der Hemiascomyceten (Saccharomycetes). Die Bezeichnung „Saccharomyces“ kommt aus dem Altgriechischen und bedeutet „Zuckerpilz“, der Begriff „cerevisiae“ ist lateinisch und bedeutet „des Bieres“. Bei der Lebensmittelherstellung (z. B. Bier, Wein und Brot) macht man sich die Eigenschaften der Hefe Glukose zu vergären und Alkohol zu produzieren zu Nutze. Aber auch in der molekularbiologischen Forschung ist die Bäckerhefe ein beliebter Modellorganismus, da sie ein einfach zu kultivierender Eukaryot und darüber hinaus genetisch gut manipulierbar ist.

Die Bäckerhefe vermehrt sich durch Knospung, auch Sprossung genannt. Dabei entsteht an der Mutterzelle eine Knospe, aus der nach der Abschnürung die Tochterzelle entsteht. An der Mutterzelle bleibt an der entsprechenden Stelle eine Knospungsnarbe zurück. Haploide Hefezellen teilen sich durch axiale Sprossung, bei der die Tochterzelle am proximalen Pol direkt neben der alten Knospungsnarbe der Mutterzelle entsteht (Freifelder, 1960). Die Bäckerhefe kommt in zwei Geschlechtsformen, die a und α genannt werden, vor. Durch Zellfusion und Karyogamie zweier haploider Zellen unterschiedlichen Geschlechtstyps entsteht eine diploide Hefezelle, die sich durch bipolare Sprossung teilt (Freifelder, 1960). Der bei der Konjugation stattfindende Austausch genetischen Materials ermöglicht eine höhere genetische Variabilität als die asexuelle Vermehrung durch Knospung.

In Abwesenheit eines essentiellen Nährstoffs, wie z. B. Stickstoff, gleichzeitigem Fehlen von Glukose und Vorhandensein einer nicht-fermentierbaren Kohlenstoffquelle (z. B. Azetat), können diploide Zellen sporulieren (Esposito & Klapholz, 1981). Dabei entstehen durch Meiose vier haploide Genome, die von Sporenwänden umschlossen werden. Diese vier Sporen, die auch als Tetrade bezeichnet werden, sind noch von der ehemaligen Zellwand der diploiden Zelle umgeben, dies nennt man Ascus. Die Sporen sind widerstandsfähig gegen Hitze, Kälte und Austrocknung und sie können wieder zu haploiden Zellen auskeimen, wenn die Nährstoffbedingungen sich verbessert haben (Kupiec *et al.*, 1997). Bei Mangel an Kohlenstoffquellen und gutem Stickstoffangebot

arretieren sowohl haploide als auch diploide Zellen in der G₁-Phase des Zellzyklus und gehen in eine stationäre Phase (G₀) über, um so die schlechte Nährstofflage zu überdauern (Hartwell, 1974).

S. cerevisiae ist ein dimorpher Organismus, der zwischen der einzelligen „Hefeform“ und einem mehrzelligen, filamentösen Stadium wechseln kann (Shepherd, 1988). Diploide Hefezellen bilden in Anwesenheit fermentierbarer Kohlenstoffquellen und gleichzeitigem Stickstoffmangel filamentöse Pseudohyphen. Diese entstehen durch unipolare Knospung der Zellen am distalen Ende, wobei sich die Tochterzellen nicht vollständig von den Mutterzellen ablösen. Außerdem wird die weitere Knospung bei Mutterzellen unterdrückt. Die so entstehenden, aus elongierten Zellen zusammengesetzten Ketten, zeigen eine starke Haftung am Substrat und sind in der Lage, Substrate invasiv zu durchwachsen (Gimeno *et al.*, 1992; Kron *et al.*, 1994; Gancedo, 2001; Palecek *et al.*, 2002). Da diese Zellketten morphologisch betrachtet eine Zwischenform zwischen einer fragilen Aneinanderreihung von Hefezellen und echten Hyphen darstellen, wurde der Begriff Pseudohyphen gewählt. Haploide Zellen zeigen unter bestimmten Bedingungen, wie z. B. Glukosemangel, ein ähnliches Phänomen, das als haploid invasives oder auch adhäsives Wachstum bezeichnet wird. Dabei sprossen die Zellen bipolar und bilden ebenfalls Zellketten, die adhäsiv auf Substraten, bzw. invasiv in diese hinein wachsen können. Die Zellen sind allerdings nicht so stark verlängert wie die diploiden Zellen beim Pseudohyphenwachstum (Roberts & Fink, 1994; Cullen & Sprague, 2000; Lorenz *et al.*, 2000).

Obwohl haploid invasives Wachstum und die Pseudohyphenbildung der diploiden Zellen durch unterschiedliche Umweltfaktoren induziert werden, findet die Weiterleitung der Signale größtenteils über die gleichen Signalwege und Transkriptionsfaktoren statt (Zaman *et al.*, 2008). Die beiden Wachstumsformen werden auch unter dem Begriff „filamentöses Wachstum“ zusammengefasst und dienen der Bäckerhefe vermutlich dazu, neue Nährstoffquellen zu erschließen, indem die sonst sessilen Zellen aus der Kolonie heraus in Richtung eines entfernten Substrates wachsen können (Gimeno *et al.*, 1992).

In pathogenen Pilzen, z. B. im Pflanzenpathogen *Ustilago maydis* und in der opportunistisch humanpathogenen Hefe *Candida albicans*, beeinflusst der Wechsel von der Hefeform zum filamentösen Wachstum deren Virulenz (Banuett, 1992; Banuett, 1995; Mitchell, 1998; Lengeler *et al.*, 2000). In *C. albicans* wird das filamentöse Wachstum in Serum oder Medium mit neutralem pH und einer Temperatur von 37 °C

stimuliert, was den Bedingungen im Wirtsorganismus entspricht. Mutanten von *C. albicans*, die nicht mehr in der Lage sind filamentös zu wachsen, sind auch nicht mehr virulent (Lo *et al.*, 1997).

1.2 Nukleozytoplasmatischer Transport

1.2.1 Überblick über den Kerntransport

Das charakteristische und namensgebende Merkmal eukaryotischer Zellen ist der Zellkern. Im Gegensatz zu prokaryotischen Zellen ist das Genom in diesem speziellen Kompartiment untergebracht, das durch die Kernhülle gebildet wird. Die Kernhülle ist eine Lipiddoppelschicht, die das Zytoplasma vom Nukleoplasma trennt. Die Kompartimentierung einer eukaryotischen Zelle ermöglicht die Trennung verschiedener zellulärer Prozesse. So laufen z. B. Transkription und Translation von Genen bzw. mRNA räumlich und zeitlich getrennt voneinander ab, während in Prokaryoten die Translation bereits beginnen kann, sobald nur ein Teil der mRNA synthetisiert wurde. Die Trennung der Prozesse in Eukaryoten ist unter anderem notwendig, weil (je nach Organismus wenige oder sehr viele) mRNA-Moleküle Introns enthalten, die durch Spleißen entfernt werden müssen. Damit die Translation einer ungespleißten mRNA noch nicht beginnen kann, ist die räumliche Trennung der Prozesse von Vorteil. Des Weiteren bietet sie eine zusätzliche Möglichkeit der Qualitätskontrolle von mRNA-Molekülen, die im Zellkern ablaufen kann und dort eventuell fehlerhafte Moleküle für die Translationsmaschinerie nicht zugänglich sind (Fasken & Corbett, 2009).

Da eukaryotische Zellen deutlich größer sind als prokaryotische und größere Genome haben, ist die Kompartimentierung auch in dieser Hinsicht vorteilhaft. Die DNA ist in einem begrenzten Raum verpackt und in höheren Eukaryoten ist der Zellkern zusätzlich in Territorien aufgeteilt, in denen die einzelnen Chromosomen liegen (Cremer *et al.*, 2006). Bestimmten Bereichen des Zellkerns werden darüber hinaus spezielle Funktionen zugeordnet: Gene, die in der Nähe von Kernporenkomplexen liegen, sind besonders stark exprimiert, während inaktives Chromatin ebenfalls an der Kernperipherie zu finden ist, jedoch nicht in der Nähe von Kernporen (Akhtar & Gasser, 2007; Taddei, 2007; Nagai *et al.*, 2008). Nicht zuletzt bietet die Kompartimentierung der Zelle auch eine wichtige Möglichkeit zur Genregulation. So kann z. B. durch differentielle Lokalisierung von Transkriptionsfaktoren die Aktivität der entsprechenden Zielgene reguliert werden (Terry *et al.*, 2007).

Die Vorteile, die der Zellkern mit sich bringt, haben mit Sicherheit dazu beigetragen, dass sich die eukaryotischen Zellen im Laufe der Evolution zu komplexen, multizellulären Organismen entwickeln konnten. Jedoch bedeutet die räumliche Abgrenzung des Genoms auch, dass eine Vielzahl an Molekülen zwischen Zellkern und Zytoplasma hin-und-her-transportiert werden muss. So ist es erforderlich, dass im Zellkern transkribierte mRNAs ins Zytoplasma exportiert werden, um dort zu Proteinen translatiert werden zu können. Einige dieser Proteine, wie z. B. Transkriptionsfaktoren, Histone, Polymerasen und ribosomale Proteine, müssen nach ihrer Synthese in den Kern importiert werden, um dort ihre Funktion zu erfüllen. Diese Vielzahl an Transportprozessen erfordert eine komplexe Transportmaschinerie und benötigt Energie. Alle Moleküle, die zwischen Zellkern und Zytoplasma ausgetauscht werden müssen, enthalten eine Signalsequenz, die sie für den Import bzw. den Export kennzeichnet. Transportrezeptoren erkennen und binden diese Signalsequenzen und vermitteln den Transport der Moleküle durch die Kernporenkomplexe (nuclear pore complexes, NPCs), welche die Kernhülle durchspannen.

1.2.2 Kernporenkomplexe – die Orte des Geschehens

Die Kernhülle ist eine Doppelmembran, die in ihrem Aufbau der Phospholipid-Doppelschicht der Zellmembran gleicht. Die äußere Schicht ist mit Ribosomen besetzt und geht in das raue endoplasmatische Retikulum über. Die Kernhülle stellt eine Diffusionsbarriere für viele Moleküle dar. Sehr kleine Moleküle, wie Metabolite oder Ionen, können jedoch frei zwischen Kern und Zytoplasma diffundieren (Abb. 1.1). Für Proteine, die ein Molekulargewicht von 20–40 kDa nicht überschreiten, ist passive Diffusion ebenfalls möglich, jedoch ist der Flux bereits für Moleküle von 20 kDa um zwei bis drei Größenordnungen verlangsamt. Die Diffusion der Moleküle durch die Kernporen hängt jedoch nicht nur vom ihrem Molekulargewicht, sondern auch von ihrer räumlichen Struktur ab, genauer gesagt vom Stokesradius, der durch Form und Hydratisierung der Moleküle bedingt ist (Bonner, 1975; Ribbeck & Görlich, 2001; Mohr *et al.*, 2009). Größere Moleküle, wie z. B. mRNAs oder Proteine, müssen über die Membran transportiert werden (Abb. 1.1). Sowohl Transport¹ als auch Diffusion findet durch die Kernporenkomplexe statt, von denen es pro Hefezelle ca. 200 Stück gibt

¹ Da man im Allgemeinen von Kern-„Transport“ spricht, wird in dieser Arbeit ebenfalls der Begriff Transport verwendet, obwohl es sich streng genommen um erleichterte Diffusion handelt (siehe Abschnitt 1.2.5).

(Rout & Blobel, 1993). Bei höheren Eukaryoten hängt die Anzahl der Kernporen pro Zelle stark von deren Art und metabolischer Aktivität ab. Es handelt sich um sehr große Proteinkomplexe von ca. 66 MDa (*S. cerevisiae*) bzw. 125 MDa (höhere Eukaryoten), welche die Kernhülle durchspannen (Reichelt *et al.*, 1990; Rout & Blobel, 1993; Yang *et al.*, 1998).

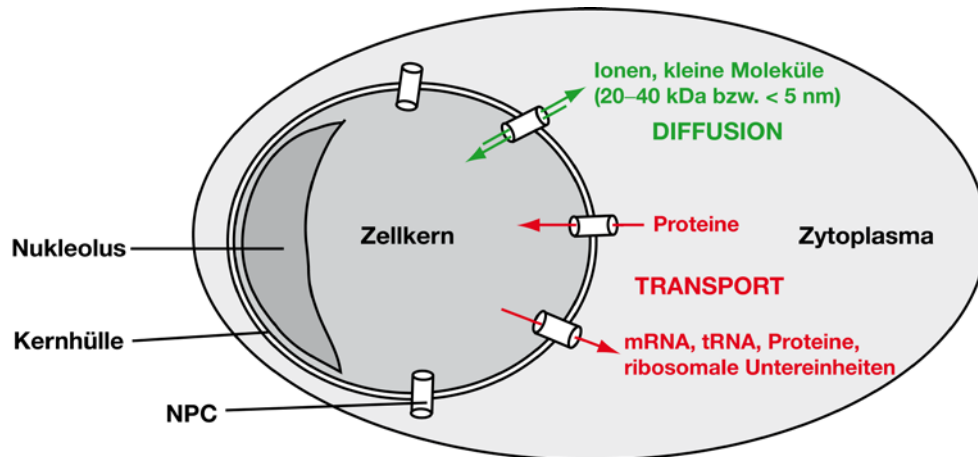


Abb. 1.1: Schematische Darstellung einer eukaryotischen Zelle. Der Zellkern ist von der Kernhülle umgeben und von Kernporenkomplexen (NPCs) durchsetzt, durch die Moleküle zwischen Kern und Zytoplasma ausgetauscht werden können. Dies geschieht bei Ionen und kleinen Molekülen (bis 40 kDa) durch Diffusion, bei größeren Molekülen (Proteine, mRNA, tRNA und ribosomale Untereinheiten) durch rezeptorvermittelten Transport.

Die allgemeine Morphologie der NPCs ist zwischen verschiedenen Organismen konserviert (Yang *et al.*, 1998). Die oktagonale symmetrische, zylindrische Form der Kernporenkomplexe kann man in drei Substrukturen gliedern: die zytoplasmatischen Filamente, ein zentrales „Gerüstwerk“ und eine nukleäre Korbstruktur (Abb. 1.2). Der zentrale Teil des NPCs hat eine Donut-ähnliche Form. Er wird von drei Ringstrukturen (zytoplasmatischer, luminaler und nukleärer Ring) gebildet, die durch acht „Speichen“ verbunden sind. Der NPC durchspannt die gesamte Kernhülle und durch Fusion von innerer und äußerer Kernhüllenmembran entsteht die Pore, durch die der Transport von Molekülen verläuft. Die Pore hat an ihrer engsten Stelle einen Durchmesser von 10 nm. Der maximale Durchmesser beträgt 38 nm, wenn sehr große Moleküle transportiert werden (Pante & Kann, 2002; Alber *et al.*, 2007). Von dem zentralen Teil des NPC gehen jeweils acht Filamente in das Kerninnere und in das Zytoplasma ab (Stoffler *et al.*, 2003; Beck *et al.*, 2004). Die Filamente, die in den Kern ragen, sind durch einen distalen Ring miteinander verbunden und bilden eine korbartige Struktur (Goldberg & Allen, 1992).

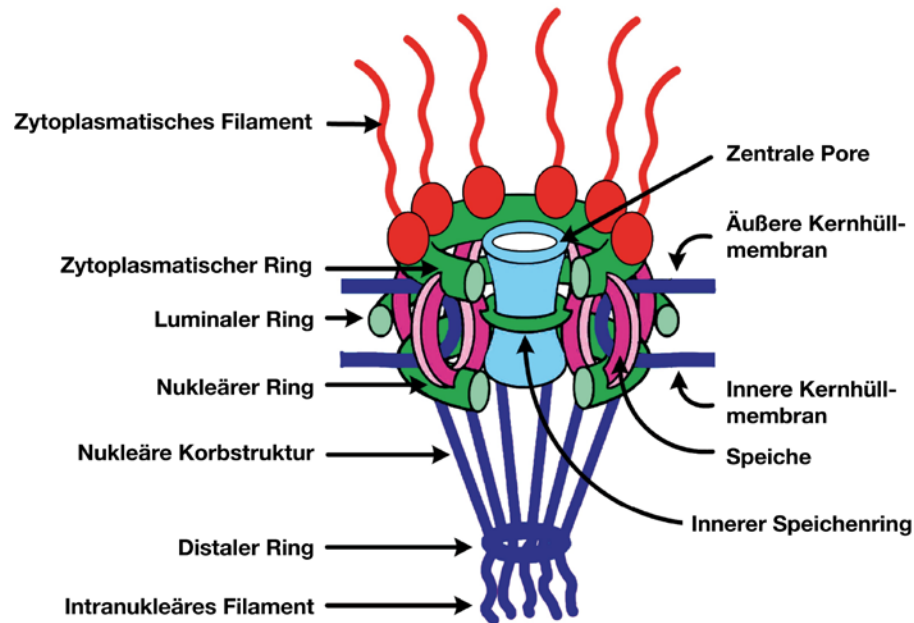


Abb. 1.2: Schematische Darstellung eines Kernporenkomplexes. Drei Ringstrukturen (zytoplasmatischer, luminaler und nukleärer Ring) bilden den zentralen Teil des NPC, der die Kernhüllmembran durchspannt und eine Pore bildet. Ins Zytoplasma und in den Kern ragen jeweils acht Filamente, wobei die nukleären Filamente eine Korbstruktur bilden. Nach Sorokin *et al.*, 2007.

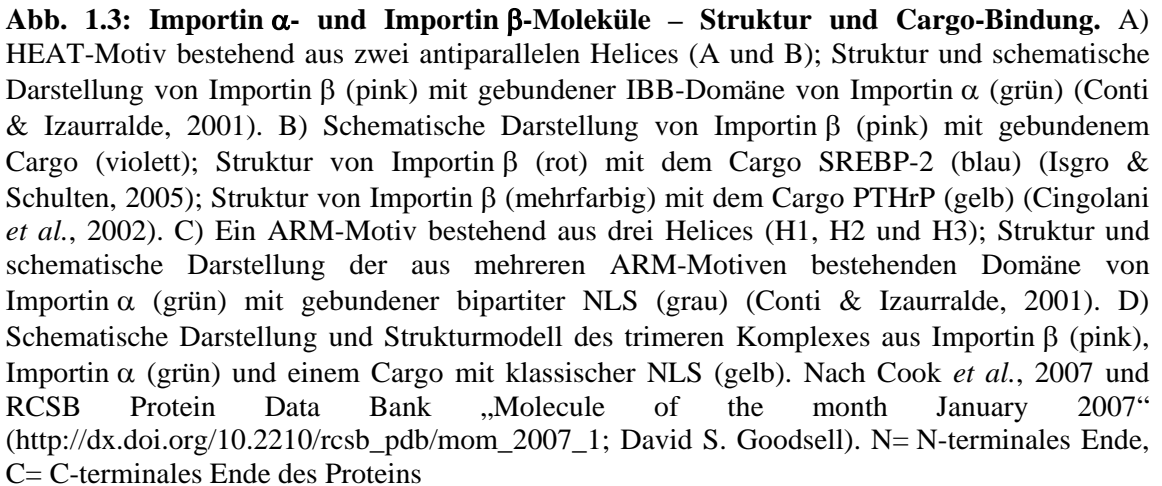
Die Proteine der Kernporenkomplexe werden Nukleoporine (Nups) genannt. Ein NPC von *S. cerevisiae* besteht insgesamt aus 456 Nukleoporinen, wobei es sich um 30 verschiedene Proteine in mehrfacher Kopiezahl handelt (Rout *et al.*, 2000). Die Nukleoporine werden in drei Klassen unterteilt: Die Transmembranproteine verankern den NPC an der Kernhülle. Die so genannten FG-Nups enthalten mehrfach die Dipeptidfolge Phenylalanin (F) – Glycin (G). Sie werden weiter unterteilt in FXFG-, GLFG- und FG-Nups, wobei X eine beliebige Aminosäure ist und L für Leucin steht (Rexach & Blobel, 1995; Allen *et al.*, 2001). Die dritte Klasse umfasst Nukleoporine, die keine FG-Motivwiederholungen enthalten. Sie bilden das Grundgerüst der Kernporenkomplexe, während die zytoplasmatischen und nukleären Filamente überwiegend aus FG-Nups bestehen (Rout *et al.*, 2000). Die FG-Nups tragen direkt zum aktiven Transport bei, da sie Interaktionspartner der Transportrezeptoren darstellen (Rexach & Blobel, 1995; Allen *et al.*, 2001; Liu & Stewart, 2005). Anhand verschiedener molekularer, biochemischer und struktureller Daten wurde die genaue Position jedes Nups im Kernporenkomplex von *S. cerevisiae* bestimmt (Alber *et al.*, 2007). Somit ist die Struktur der NPCs bis ins Detail aufgeklärt, der Mechanismus des Transports ist jedoch noch nicht vollständig erforscht.

1.2.3 Karyopherine – Transportrezeptoren zwischen Zytoplasma und Zellkern

Der Transport von Proteinen und RNA-Molekülen in den Zellkern bzw. aus dem Kern heraus wird durch lösliche Transportrezeptoren vermittelt. Die meisten dieser Proteine zählen zu der Familie der Karyopherine (Kaps) (vom griechischen „karyon“ = Kern und „pher(ein)“ = hin- oder wegbringen). In allen eukaryotischen Zellen findet man zwei strukturell verwandte Klassen von Karyopherinen: α -Karyopherine (α -Kaps) und β -Karyopherine (β -Kaps) (Abb. 1.3). Die β -Kaps können in drei Kategorien unterteilt werden, entsprechend der Transportrichtung, die sie vermitteln. Importine sind für den Import zuständig, Exportine für Protein- und RNA-Export und Transportine vermitteln sowohl Import als auch Export verschiedener Moleküle. Die α -Kaps haben die Funktion von Adaptern: sie bilden einen Komplex mit einem Cargo-Molekül und einem β -Kap (Abb. 1.3). Sie können nicht direkt mit Nukleoporinen interagieren, daher brauchen sie ein β -Kap, um den Transport ihres Cargos vermitteln zu können (Enenkel *et al.*, 1995; Görlich *et al.*, 1996).

Karyopherine bilden eine evolutionär konservierte Proteinfamilie, die vermutlich auf ein gemeinsames Vorläuferprotein zurückzuführen ist. Die Sequenzidentität der einzelnen Kaps ist sehr gering (weniger als 20 %) (Ström & Weis, 2001; Cook *et al.*, 2007). Jedoch haben die Proteine ähnliche Molekulargewichte (95–145 kDa) und einen sauren isoelektrischen Punkt (4,0–5,0) (Chook & Blobel, 2001). Alle β -Kaps haben im N-terminalen Bereich eine Bindestelle für die GTP-gebundene Form der kleinen GTPase Ran. Sie binden Cargo-Moleküle über eine C-terminale Domäne und interagieren über eine oder mehrere Domänen direkt mit verschiedenen Nukleoporinen (Radu *et al.*, 1995; Görlich *et al.*, 1997; Chook & Blobel, 1999; Vetter *et al.*, 1999).

Strukturvorhersagen und -analysen ergaben, dass alle β -Karyopherine aus multiplen (18–20) HEAT-Motiven bestehen (Chook & Blobel, 1999; Cingolani *et al.*, 1999; Conti *et al.*, 2006) (Abb. 1.3A). Ein HEAT-Motiv ist eine aus ca. 40 Aminosäuren bestehende Helix-Loop-Helix-Struktur, deren Bezeichnung von den Proteinen stammt, in denen das Motiv ursprünglich identifiziert wurde (**H**untingtin, **E**longationsfaktor 3, **P**R65**A**-Untereinheit der Protein-Phosphatase 2A und **T**OR1 Lipidkinase) (Andrade & Bork, 1995). Man findet HEAT-Motive in vielen eukaryotischen Proteinen. Eine HEAT-Einheit hat eine rechtsgängige superhelikale Struktur, die aus zwei antiparallelen Helices besteht. Diese sind durch einen Loop verbunden. Eine der Helices (Helix A) ist gebogen, Helix B ist gerade. Die HEAT-Motive der Karyopherine liegen fast parallel



zueinander und bilden zusammen eine längliche Struktur mit superhelikalem Twist (Chook & Blobel, 1999; Cingolani *et al.*, 1999). Die Motive sind so angeordnet, dass die A-Helices die äußere Oberfläche des Proteins bilden, während die B-Helices an der inneren konkaven Fläche des C-förmigen Proteins zu finden sind. Im Zentrum des Proteins befindet sich darüber hinaus in einigen Kaps ein langer Loop aus sauren Aminosäuren, der die Helices A und B des achten HEAT-Motives verbindet und an der Bindung von Ran und vermutlich auch von Cargo-Molekülen beteiligt ist (Chook & Blobel, 1999; Chook *et al.*, 2002; Cook *et al.*, 2007) (Abb. 1.3A). Die Struktur der Karyopherine, die gewisse Ähnlichkeit mit einer Sprungfeder hat, verleiht ihnen eine hohe Flexibilität, die für die Interaktionen mit verschiedenen Proteinen von Bedeutung ist. Strukturelle Daten verschiedener Importine zeigen, dass die Karyopherine sich häufig um ihre Cargo-Moleküle herumwickeln (Conti *et al.*, 2006) (Abb. 1.3B). Dies deutet auch darauf hin, dass die Interaktionsflächen relativ komplex sein können. Die Interaktion zwischen Karyopherin und Cargo geschieht vermutlich über einen „induced fit“-Mechanismus (induzierte Passform), der bei Enzym-Substrat-Bindungen häufig eine Rolle spielt. Dabei ist die Bindung der Interaktionspartner zunächst schwach, durch eine Konformationsänderung eines der Proteine wird jedoch die Bindungsstelle optimiert und damit die Interaktion verstärkt (Koshland, 1958; Bosshard, 2001; Conti *et al.*, 2006).

In *S. cerevisiae* wurden 14 β -Kaps identifiziert und ein α -Kap (Pemberton *et al.*, 1998; Wozniak *et al.*, 1998; Ström & Weis, 2001; Mosammaparast & Pemberton, 2004), in höheren Eukaryoten mehr als 22 β -Kaps und sechs α -Kaps (Malik *et al.*, 1997; Görlich & Kutay, 1999; Kutay *et al.*, 2000; Plafker & Macara, 2000; Mosammaparast & Pemberton, 2004; Pemberton & Paschal, 2005). Zehn der β -Karyopherine aus *S. cerevisiae* sind Importine: Kap95 (Rsl1), Kap104, Mtr10 (Kap111), Kap123 (Yrb4), Pse1 (Kap121), Kap114, Nmd5 (Kap119), Sxm1 (Kap108), Kap120 und Kap122 (Pdr6). Drei β -Kaps wurden als Exportine beschrieben: Crm1 (Xpo1, Kap124), Los1 (Kap127) und Cse1 (Kap109). Msn5 (Kap142) ist das einzige bekannte Transportin in Hefe, das sowohl Import als auch Export vermittelt. Mit Ausnahme der Proteine Sxm1 und Kap122 haben die β -Kaps aus *S. cerevisiae* Orthologe in multizellulären Organismen (Tabelle 1). Dabei haben acht der Karyopherine direkt korrespondierende orthologe Proteine, während es bei vier Proteinen (Nmd5, Mtr10, Pse1 und Kap104) zu Genduplikationen und Diversifikation gekommen ist (Quan *et al.*, 2008). Nur fünf der Karyopherine aus *S. cerevisiae* sind essentiell (Srp1, Kap95, Pse1, Crm1 und Cse1),

aber einige der nicht essentiellen Kaps transportieren dennoch essentielle Cargo-Moleküle (Tabelle 1). Dies lässt sich dadurch erklären, dass ein Karyopherin mehrere Cargo-Moleküle erkennen und transportieren kann und andererseits ein bestimmtes Molekül nicht zwangsläufig auf ein bestimmtes Karyopherin angewiesen ist (Mosammaparast & Pemberton, 2004).

Tabelle 1: Die Karyopherine von Hefe- bzw. Säugerzellen und deren Cargos

Hefe	Säuger	Cargos (Hefe)	Cargos (Säuger)
<i>Import</i>			
Srp1 , Kap60 ★	Importin α	Gcn4 ¹ , Gln3 ² , Swi6 ³ , Clb2 ⁴ , Prp20 ⁴ , Cdc6 ⁴ , Cdc45 ⁴ , Swi5 ⁴	SV40 T-Antigen ⁴⁹ , Nucleoplasmin ⁴⁹ , Glukokortikoidrezeptor ⁵⁰
Kap95 , Rsl1 ★	Importin β 1	Gal4 ⁵ , Histone (H2A, H2B) ⁶ , Asr1 ⁷	Histon H1 ⁵¹ , SREBP-2 ⁵² , HIV-Rev ⁵³ , CyclinB ⁵⁴ , PTHrP ⁵⁵ , ribosomale Proteine ⁵⁶ , Proteine mit argininreicher NLS (z. B. Rex Protein von HTLV-1 ⁵⁷),
Kap104	Transportin 1, Transportin 2	Tfg2 ³¹ , mRNA-Bindeproteine: Nab2 ⁸ , Hrp1 ⁸	hnRNP A1 ⁵⁸ , ribosomale Proteine ⁵⁶ , Proteine mit PY-NLS ⁵⁹
Mtr10 , Kap111	Importin 13, Transportin3	mRNA-Bindeproteine: Npl3 ⁹ , Hrb1 ⁹	Proteine mit SR-Domäne ⁶⁰ , SUMO-konjugierendes Enzym UBC9 ⁶¹
Kap123 , Yrb1	Importin 4	Histone (H2A, H2B, H3, H4) ^{6,10} , ribosomale Proteine ^{11, 12, 13} , Histon-Acetyltransferase Komplex SAS-I ¹⁴ , SRP-Proteine (Srp14p, Srp21p, Srp68, Srp72p) ¹⁵ , HO-Endonuklease ¹⁶ , Asr1 ⁷	Ribosomales Protein S3a ⁶² , Vitamin D Rezeptor ⁶³
Pse1 , Kap121 ★	Importin 5 (RANBP5), RANBP6	Pho4 ¹⁷ , Ste12 ¹⁸ , Spo12 ¹⁹ , Pdr1 ²⁰ , Yap1 ²¹ , Aft1 ²² , Yra1 ²³ , Rpl25 ¹² , Nop1 ²⁴ , Sof1 ²⁴ , Asr1 ⁷ , SRP-Proteine (Srp14p, Srp21p, Srp68, und Srp72p) ¹⁵ , Histone (H2A, H2B, H3, H4) ^{6,10} , ribosomale Proteine ^{11, 12, 13}	RanBP5: ribosomale Proteine ⁵⁶
Kap114	Importin 9	Asr1 ⁷ , Histone H2A und H2B ⁶ , Nap1 ²⁵ , Sua7 ²⁵ , TBP ²⁶	Ribosomales Protein S7 ⁶²
Nmd5 , Kap119	Importin 7, Importin 8	Hog1 ²⁷ , Crz1 ²⁸ , Ssa4 ²⁹ , Asr1 ⁷ , TFIIS ³⁰	Ribosomale Proteine ⁵⁶ , Histon H1 ⁵¹ , Glukokortikoidrezeptor ⁵⁰
Sxm1 , Kap108	---	Asr1 ⁷ , Tfg2 ³¹ , Lhp1 ³² , Rpl25 ³²	---
Kap120	Importin 11	Tfg2 ³¹ , Rpf1 ³³ , Swi6 ³ , HO-Endonuklease ¹⁶	UbcM2 ⁶⁴ , ribosomales Protein L12 ⁶⁴
Kap122 , Pdr6	---	TFIIA (Toa1, Toa2) ³⁴	---

* Posttranskriptionaler Regulator des humanen T-Zell-Leukämie Virus Typ 1 (HTLV-1)

<i>Export</i>			
Crm1 , Kap124, Xpo1 ★	Crm1	Hog1 ²⁷ , Yrb2 ³⁵ , Yap1 ³⁶ , Clt1 ³⁷ , Ace2 ³⁷ , Cdc14 ³⁸	U snRNAs ⁶⁵ , 5S rRNA ⁶⁵ , HIV- Rev ⁶⁵ , PKA-Inhibitor (PKI) ⁶⁶
Los1 , Kap127	Exportin-t	tRNA ³⁹	tRNA ⁶⁷
Cse1 , Kap109 ★	CAS	Srp1 (Kapα) ⁴⁰	Importin α's ⁶⁸
<i>Import/Export</i>			
Msn5 , Kap142, Ste21	Exportin 5	<i>Import</i> : RPA (replication Protein A) ⁷² ; <i>Export</i> : Aft1 ²² , HO-Endonuklease ⁴¹ , Pho4 ¹⁷ , Mep2 ⁴² , Swi6 ⁴³ , Crz1 ⁴⁴ , Cdh1 ⁴⁵ , Far1 ⁴⁶ , Mig1 ⁴⁷ , Ssa4 ⁴⁸	ILF3 ⁶⁹ , eEF-1A ⁷⁰ , pre-miRNA ⁷¹ , tRNA ⁷⁰ , minihelix RNA ⁶⁹

Standardnamen der Proteine sind fett gedruckt.

★ = essentielle Proteine in *S. cerevisiae*

¹ Pries *et al.*, 2004, ² Carvalho *et al.*, 2001, ³ Kim *et al.*, 2010, ⁴ Hahn *et al.*, 2008, ⁵ Chan *et al.*, 1998, ⁶ Mosammaparast *et al.*, 2001, ⁷ Fries *et al.*, 2007, ⁸ Lee & Aitchison, 1999, ⁹ Senger *et al.*, 1998, ¹⁰ Mosammaparast *et al.*, 2002, ¹¹ Gavin *et al.*, 2006, ¹² Schlenstedt *et al.*, 1997, ¹³ Rout *et al.*, 1997, ¹⁴ Schaper *et al.*, 2005, ¹⁵ Grosshans *et al.*, 2001, ¹⁶ Bakhrat *et al.*, 2006, ¹⁷ Kaffman *et al.*, 1998, ¹⁸ Leslie *et al.*, 2002, ¹⁹ Ho *et al.*, 2002, ²⁰ Delahodde *et al.*, 2001, ²¹ Isoyama *et al.*, 2002, ²² Ueta *et al.*, 2003, ²³ Zenklusen *et al.*, 2001, ²⁴ Leslie *et al.*, 2004, ²⁵ Hodges *et al.*, 2005, ²⁶ Pemberton *et al.*, 1999, ²⁷ Ferrigno *et al.*, 1998, ²⁸ Polizotto & Cyert, 2001, ²⁹ Quan *et al.*, 2004, ³⁰ Albertini *et al.*, 1998, ³¹ Süel & Chook, 2009, ³² Rosenblum *et al.*, 1997, ³³ Caesar *et al.*, 2006, ³⁴ Titov & Blobel, 1999, ³⁵ Noguchi *et al.*, 1999, ³⁶ Yan *et al.*, 1998, ³⁷ Jensen *et al.*, 2000, ³⁸ Bembenek *et al.*, 2005, ³⁹ Hellmuth *et al.*, 1998, ⁴⁰ Solsbacher *et al.*, 1998, ⁴¹ Bakhrat *et al.*, 2008, ⁴² Lorenz & Heitman, 1998, ⁴³ Queralt & Igual, 2003, ⁴⁴ Boustany & Cyert, 2002, ⁴⁵ Jaquenoud *et al.*, 2002, ⁴⁶ Blondel *et al.*, 1999, ⁴⁷ DeVit & Johnston, 1999, ⁴⁸ Quan *et al.*, 2006, ⁴⁹ Fontes *et al.*, 2000, ⁵⁰ Freedman & Yamamoto, 2004, ⁵¹ Jäkel *et al.*, 1999, ⁵² Nagoshi *et al.*, 1999, ⁵³ Truant & Cullen, 1999, ⁵⁴ Takizawa *et al.*, 1999, ⁵⁵ Lam *et al.*, 1999, ⁵⁶ Jäkel & Görlich, 1998, ⁵⁷ Palmeri & Malim, 1999, ⁵⁸ Fridell *et al.*, 1997, ⁵⁹ Süel *et al.*, 2008, ⁶⁰ Lai *et al.*, 2000, ⁶¹ Mingot *et al.*, 2001, ⁶² Jäkel *et al.*, 2002, ⁶³ Miyauchi *et al.*, 2005, ⁶⁴ Plafker & Macara, 2000, ⁶⁵ Fischer *et al.*, 1995, ⁶⁶ Wen *et al.*, 1995, ⁶⁷ Arts *et al.*, 1998, ⁶⁸ Kutay *et al.*, 1997, ⁶⁹ Gwizdek *et al.*, 2004, ⁷⁰ Bohnsack *et al.*, 2002, ⁷¹ Lund *et al.*, 2004, ⁷² Yoshida & Blobel, 2001

Die am besten untersuchten Karyopherine sind die humanen Proteine Importin β1 und Importin α, deren Homologe in Hefe Kap95 und Srp1 sind. Sie wurden als Transportfaktoren für Proteine mit klassischen Kernlokalisierungssignalen (nuclear localization signal, NLS) identifiziert (zu NLSs siehe Abschnitt 1.2.4). Importin α fungiert als Adaptorprotein, das die NLS des Cargos bindet und mit Importin β1 interagiert, welches seinerseits an die Nukleoporene der NPCs binden kann (Görlich *et al.*, 1995; Moroianu *et al.*, 1995). Importin α hat eine flexible N-terminale Importin β-Bindedomäne (IBB) und eine strukturierte NLS-Bindedomäne. Die NLS-Bindedomäne von Srp1 (*S. cerevisiae*) besteht aus 10 Armadillo (ARM)-Motiven, die jeweils aus drei Helices bestehen (Conti *et al.*, 1998) (Abb. 1.3C). Armadillo-Motive

wurden in dem Protein ARM von *Drosophila melanogaster* entdeckt und danach benannt (Peifer *et al.*, 1994). Sie bilden eine rechtsgängige Superhelix, die eine flache Vertiefung hat, in der die NLS gebunden wird. Kristallstrukturen von Importin α mit der monopartiten NLS des SV40 T-Antigen Proteins (siehe Abschnitt 1.2.4) zeigen, dass diese NLS in einer gestreckten Form entlang der Hauptbindetasche von Importin α bindet. Bipartite NLSs binden an beide Bindetaschen von Importin α . Die ersten basischen Reste binden in der Nebentasche, während die Reste des zweiten basischen Motivs an die Hauptbindetasche binden. Die Lysin-Reste der NLS liegen dabei zwischen hydrophoben Indolringen des Karyopherins, die von konservierten Tryptophan-Resten stammen und bilden Salzbrücken mit negativ geladenen Resten in der Bindetasche (Conti *et al.*, 1998; Kobe, 1999; Conti & Kuriyan, 2000; Fontes *et al.*, 2000; Conti *et al.*, 2006). Die IBB-Domäne von Importin α besteht aus 40 konservierten Resten und hat einen basischen Charakter (Görlich *et al.*, 1996; Weis *et al.*, 1996). Sie kann entweder *in trans* mit Importin β interagieren oder *in cis* mit der NLS-Bindetasche und hat somit eine autoinhibitorische Funktion. Wenn Importin β nicht gebunden ist, verhindert sie die Bindung von NLSs, denn sie enthält einen Bereich mit der Aminosäuresequenz KRR, der mit den klassischen NLSs um die NLS-Bindestelle konkurriert. Dieser Mechanismus trägt zum effizienten Kerntransport bei, indem einerseits die Freilassung des Cargos im Kern erleichtert wird und gleichzeitig eine erneute Bindung des Cargos im Kern verhindert wird. Die Autoinhibition wird durch Bindung von Importin β aufgehoben (Fanara *et al.*, 2000; Catimel *et al.*, 2001; Harreman *et al.*, 2003; Harreman *et al.*, 2003).

Von dem menschlichen Kap95-Homolog Importin $\beta 1$ sind drei verschiedene Cargo-gebundene Kristallstrukturen bekannt: Importin $\beta 1$ mit der IBB-Domäne von Importin α , mit SREBP-2 (sterol regulatory element-binding protein 2) und mit PTHrP (parathyroid hormone-related protein). Die IBB-Domäne, bzw. die Cargos binden in allen drei Fällen an der inneren konkaven Fläche der Superhelix von Importin $\beta 1$ (Abb. 1.3B und 1.3D).

Die IBB-Domäne wird von den HEAT-Motiven 7–19 gebunden und eng von diesen umschlossen (Abb. 1.3A und 1.3D). Die innere Oberfläche von Importin $\beta 1$ enthält viele saure Reste und bindet somit gut an die positiv geladene IBB-Domäne. Die intermolekulare Interaktion ist sehr eng: 42 % der Oberfläche der IBB-Domäne sind in Kontakt mit Importin $\beta 1$. Für die Interaktion ist höchst wahrscheinlich eine Konfor-

mationsänderung des β -Karyopherins erforderlich und in ungebundener Form ist das Protein vermutlich weniger stark gekrümmt (Cingolani *et al.*, 1999).

Der humane Transkriptionsfaktor SREBP-2 interagiert mit Importin $\beta 1$ als Dimer über seine Helix-Loop-Helix-Leucin-Zipper Domäne (Abb. 1.3B). Wie bei der Interaktion mit der IBB-Domäne sind auch hier die HEAT-Motive 7–19 an der Bindung beteiligt. Jedoch werden hier nicht wie bei der IBB-Domäne elektrostatische Wechselwirkungen mit den sauren Aminosäuren eingegangen, sondern hauptsächlich hydrophobe Kontakte mit aromatischen Resten von Importin $\beta 1$ ausgebildet. Das Helix-Loop-Helix-Zipper Motiv wird von verlängerten Helices der HEAT-Motive 7 und 17 umschlossen, wodurch das Protein wie von Essstäbchen gehalten wird (Lee *et al.*, 2003).

Das Protein PTHrP enthält eine nicht-klassische NLS (siehe Abschnitt 1.2.4), die von Importin $\beta 1$ erkannt wird. Die Bindung erfolgt, wie bei den zuvor beschriebenen Interaktionen, an der Innenseite des Karyopherins, allerdings in diesem Fall im N-terminalen Teil zwischen den HEAT-Motiven 2 und 11 (Abb. 1.3B). Diese Region überlappt mit der RanGTP-Bindedomäne. Das Kernimportsignal von PTHrP ist ungefaltet und bildet Wasserstoffbrückenbindungen zu Asparagin- und Glutaminresten von Importin $\beta 1$ aus (Cingolani *et al.*, 2002; Cook *et al.*, 2007).

Anhand der drei beschriebenen Strukturen wird deutlich, dass unterschiedliche Bindestellen des Karyopherins für verschiedene Cargos genutzt werden können und das Importin auch seine Konformation teilweise ändert, um die Interaktion zu ermöglichen oder zu verbessern.

Obwohl bereits einige Strukturanalysen von Karyopherinen mit ihren Cargos vorliegen, ist noch nicht klar, wie jedes Karyopherin mehrere strukturell unterschiedliche Proteine und verschiedene NLSs selektiv erkennen kann. Außerdem ist es interessant, dass verschiedene Karyopherine trotz ihrer geringen Sequenzähnlichkeit teilweise das gleiche Cargo binden können. So können z. B. Histonproteine von mindestens vier verschiedenen Kaps transportiert werden (Mosammaparast *et al.*, 2001; Mühlhäusser *et al.*, 2001).

Der Vollständigkeit halber sei auch erwähnt, dass Karyopherine nicht nur als Transportrezeptoren fungieren, sondern auch an anderen Prozessen beteiligt sind. In *Xenopus laevis* konnte gezeigt werden, dass RanGTP die Rekrutierung von Nups zu Chromatin fördert, sowie deren Insertion in Membranen und Assoziation von Nups untereinander. Karyopherin β hingegen inhibiert die Assemblierung von NPC-Komponenten (Harel *et al.*, 2003; Walther *et al.*, 2003). Ein weiteres Beispiel ist Crm1,

das die Re-Replikation von DNA verhindert, indem es den Mcm2-7 Helikase-Komplex inhibiert (Yamaguchi & Newport, 2003). Schließlich konnte für das Karyopherin α/β -Heterodimer gezeigt werden, dass es als direkter Inhibitor von Proteinen wirkt, die für die Mikrotubuli-Polymerisierung notwendig sind (Gruss *et al.*, 2001; Nachury *et al.*, 2001; Wiese *et al.*, 2001).

1.2.4 Lokalisierungssignale – molekulare Adressen für Kernimport und Kernexport

Proteine, die von der Kerntransportmaschinerie erkannt werden, enthalten normalerweise Lokalisierungssignale, die als Kernlokalisierungssignal (nuclear localization signal, NLS) bzw. Kernexportsignal (nuclear export signal, NES) bezeichnet werden. Sie werden definiert als Teil eines Kerntransportcargos, der notwendig für Import/Export ist, hinreichend für Import/Export eines anderen Proteins, Transportrezeptoren direkt binden kann und dessen Transport verhindert wird, wenn der Transportfaktor fehlt (Lange *et al.*, 2007).

Man unterscheidet bei den NLSs zwischen klassischen und nicht-klassischen Signalen, wobei man die klassischen in monopartite und bipartite NLSs unterteilt. Es handelt sich dabei generell um kurze Motive, die reich an basischen Aminosäuren sind. Die erste monopartite NLS wurde in dem großen Tumor-Antigen (T-Ag) des Virus SV40 identifiziert und hat die Sequenz PKKKRKV, in der das Lysin an Position 3 kritisch für die Funktion ist (Kalderon *et al.*, 1984; Kalderon *et al.*, 1984; Lanford & Butel, 1984; Lanford *et al.*, 1986). Die bipartiten NLSs hingegen bestehen aus zwei voneinander abhängigen basischen Motiven, die durch 10–12 variable Aminosäuren getrennt sind. Die NLS in dem Protein Nukleoplasmin von *Xenopus laevis* ist ein solches bipartites Motiv und hat die Sequenz **KRPAATKKAGQAKKKK** (Dingwall *et al.*, 1982; Robbins *et al.*, 1991). Für die monopartiten NLSs wurde das Konsensusmotiv K(K/R)X(K/R), für die bipartiten das Motiv KRX_{10–12}KRXK definiert (Lange *et al.*, 2007). Vor Kurzem konnte darüber hinaus gezeigt werden, dass die variable Region zwischen den beiden basischen Motiven von bipartiten NLSs bis zu 29 Reste lang sein kann und deren Sequenz eine Rolle für die Funktion spielt (Lange *et al.*, 2010). Die klassischen NLSs werden, wie bereits erwähnt, von dem Importin α/β -Heterodimer erkannt, wobei Importin α die NLS erkennt und bindet, während Importin β den Kontakt zu den Nukleoporinen vermittelt. Allerdings gibt es auch Beispiele, wo

klassische NLSs direkt von Importin β gebunden werden, z. B. bei dem Transkriptionsfaktor Gal4 aus *S. cerevisiae* (Chan *et al.*, 1998).

Ein weiteres bekanntes NLS-Motiv wurde im Homöodomänenprotein MAT α 2 aus *S. cerevisiae* identifiziert. Dabei handelt es sich um ein Motiv aus geladenen Aminosäuren, das von ungeladenen Resten durchsetzt ist (KIPIK) (Hall *et al.*, 1984; Hall *et al.*, 1990). Dieses Motiv wurde auch in anderen Proteinen gefunden, jedoch ist nicht bekannt, von welchen Karyopherinen die NLS gebunden wird.

Die nicht-klassischen NLSs haben keine definierten Konsensussequenzen und sind daher meist nur experimentell bestimmbar. Oft enthalten sie viele basische Aminosäuren, z. B. ist dies bei den Histonproteinen H2A, H2B, H3 und H4 der Fall (Mosammaparast *et al.*, 2001). In manchen RNA-Bindeproteinen findet man arginin- und glycinreiche NLSs (Lee & Aitchison, 1999). Oftmals sind die nicht-klassischen NLSs auch deutlich größer als die klassischen, da die dreidimensionale Struktur teilweise für die Erkennung von Bedeutung ist (Rosenblum *et al.*, 1998; Truant *et al.*, 1998; Zhu *et al.*, 2005).

Die NLS des Spleißing-Faktors hnRNP A1, die so genannte M9-NLS, besteht aus 38 Aminosäuren, ist glycinreich und enthält wenige basische Reste (Pollard *et al.*, 1996). Anhand der Struktur des humanen Kap β 2 mit der M9-NLS und durch Vergleich mit anderen Kap β 2-Cargos, konnten Regeln für die Erkennung von NLSs durch dieses Importin aufgestellt werden (Lee *et al.*, 2006). Die NLSs, die von Kap β 2 gebunden werden, zeigen generell nur wenig Sequenzähnlichkeit. Jedoch sind sie alle relativ lang (30–40 Aminosäuren), reich an Glycin- und Serinresten und haben einen basischen Charakter (Regel 2). Darüber hinaus hat die NLS im ungebundenen Zustand keine Sekundärstruktur, sie stellt also ein lineares Epitop dar (Regel 1). Trotz der geringen Sequenzähnlichkeiten konnten zwei konservierte Regionen identifiziert werden (Regel 3): Am C-terminalen Teil der NLS befindet sich ein PY (Prolin – Tyrosin)-Motiv, das für die Interaktion mit Kap β 2 wichtig ist. Als Konsensussequenz für den C-terminalen Teil der NLS wurde R/K/H X₂₋₅ PY definiert. Diesen NLSs wurde die Bezeichnung PY-NLS gegeben (Lee *et al.*, 2006). Man kann die PY-NLSs weiterhin in zwei Klassen unterteilen. Eine Klasse hat 11–13 Reste vor dem PY-Motiv vier aufeinander folgende hydrophobe Aminosäuren (hydrophobe PY-NLS), die andere Klasse hat in dieser Region vermehrt basische Reste (basische PY-NLS). In *S. cerevisiae* wurden ebenfalls Proteine mit PY-NLS identifiziert, die mit dem Kap β 2-Homolog Kap104 interagieren (Lange *et al.*, 2008).

Von ca. 60 Proteinen aus *S. cerevisiae* wurden bisher die NLSs bzw. NLS-enthaltende Regionen identifiziert. Davon sind 16 klassische NLSs, 15 werden direkt von β -Kaps erkannt und von den restlichen 29 NLSs ist der Importmechanismus unbekannt (Nguyen Ba *et al.*, 2009). Häufig überlappen NLSs mit DNA-Bindedomänen. Bei 90 % der Proteine, von denen sowohl DNA-Bindedomäne als auch NLS bekannt waren, konnte gezeigt werden, dass die beiden Regionen überlappen (Cokol *et al.*, 2000). Dies deutet darauf hin, dass die DNA und die Importine ähnliche Motive erkennen. Da viele Proteine, die ihre Funktion im Zellkern erfüllen, an die DNA binden, macht es aus evolutionärer Sicht Sinn, diese Regionen auch als Bindemotiv für Importine zu nutzen. In manchen Proteinen von *Escherichia coli* findet man NLS-ähnliche Sequenzen und viele von diesen Regionen sind tatsächlich auch für DNA-Bindung zuständig. Diese Tatsache unterstützt die Hypothese zur Evolution von NLSs aus DNA-Bindedomänen (Cokol *et al.*, 2000).

Über Kernexportsignale ist generell weniger bekannt als über NLSs. Das am besten charakterisierte Motiv ist eine hydrophobe, leucinreiche NES, die man in allen Eukaryoten finden kann: **LXXXLXXLXL** (Fischer *et al.*, 1995; Bogerd *et al.*, 1996). Die Leucin-Reste können auch durch andere hydrophobe Aminosäuren ersetzt werden und die Aminosäuren dazwischen können in ihrer Anzahl variieren. Mehr als 75 Proteine mit einer solchen NES wurden bereits identifiziert (la Cour *et al.*, 2003). Diese Motive werden von dem Exportin Crm1 erkannt (Paraskeva *et al.*, 1999; Johnson *et al.*, 2002). Andere Proteine enthalten keine leucinreichen NESs und werden erst dann exportiert, wenn sie an einer bestimmten Stelle phosphoryliert wurden, z. B. ist dies bei den Proteinen Pho4 und Mig1 aus *S. cerevisiae* der Fall (Hood & Silver, 1999; Komeili & O'Shea, 1999).

1.2.5 Kerntransportzyklus und Mechanismus der Translokation

In diesem Kapitel wird der Mechanismus des Kerntransportes mit einem Schwerpunkt auf den Import erläutert. Dabei wird zunächst der für die Bildung und Dissoziation von Karyopherin-Cargo-Komplexen wichtige RanGTP-Gradient erklärt, dann der Importzyklus durch Importin β , sowie durch Importin α/β -Heterodimere beschrieben. Schließlich werden zwei Hypothesen zum Mechanismus des Translokationsprozesses durch den NPC erläutert.

Die kleine GTPase Ran, die zu der Familie der Ras-Proteine gehört, ist ein zentraler Regulator des Kerntransportes (Moore & Blobel, 1993). In *S. cerevisiae* gibt es zwei nahezu identische Ran-Homologe, Gsp1 und Gsp2. Während *GSP1* ein essentielles Gen ist, das stark exprimiert wird, ist die Expression von *GSP2* nur unter bestimmten Wachstumsbedingungen aktiviert und nicht essentiell (Belhumeur *et al.*, 1993). Ran gewährleistet die Direktionalität der Transportprozesse, indem es die Bildung von Kap-Cargo-Komplexen reguliert. Es hat eine charakteristische Nukleotidbindetasche, die sowohl GTP als auch GDP binden kann, weshalb das Protein in zwei unterschiedlichen Zuständen, RanGTP und RanGDP, vorliegen kann. Des Weiteren kann Ran mit β -Kaps interagieren, was für den Kerntransport von entscheidender Bedeutung ist (Rexach & Blobel, 1995; Scheffzek *et al.*, 1995).

Für die Umwandlung von RanGTP zu RanGDP sind das RanGTPase-aktivierende Protein (RanGAP) (Rna1 in *S. cerevisiae*) und das Ran-Bindeprotein RanBP1 (Yrb1 in *S. cerevisiae*) zuständig. RanGAP erhöht die intrinsische Aktivität von Ran, GTP zu GDP zu hydrolysieren, um mindestens das 10.000-fache. In Gegenwart von RanBP1, welches an RanGTP bindet, ist die Hydrolyseaktivität nochmals um das 10-fache gesteigert. Dabei wird vermutlich das C-terminale Ende von Ran so modifiziert, dass RanGAP besseren Zugang zu dem Protein hat (Bischoff *et al.*, 1994; Bischoff *et al.*, 1995; Vetter *et al.*, 1999). RanGAP ist im Zytoplasma lokalisiert, weshalb in diesem Kompartiment hauptsächlich RanGDP vorliegt. Damit Ran vom GDP- in den GTP-gebundenen Zustand übergeht, ist der Guaninnukleotid-Austauschfaktor (RanGEF) (Prp20 in *S. cerevisiae*) erforderlich. Dieser fördert die Dissoziation von GDP und ermöglicht dadurch die Bindung von GTP an Ran (Bischoff & Ponstingl, 1991; Klebe *et al.*, 1995). RanGEF besitzt ein Kernlokalisierungssignal und bindet außerdem an die Histone H2A und H2B, weshalb es im Kern lokalisiert ist (Ohtsubo *et al.*, 1989; Nemergut & Macara, 2000; Nemergut *et al.*, 2001). Die differentielle Lokalisierung von RanGAP, RanBP1 und RanGEF bewirkt, dass ein Gradient von RanGDP und RanGTP über die Kernhülle hinweg besteht, wobei im Zellkern vorwiegend RanGTP vorliegt, während im Zytoplasma die GDP gebundene Form von Ran zu finden ist (Abb. 1.4).

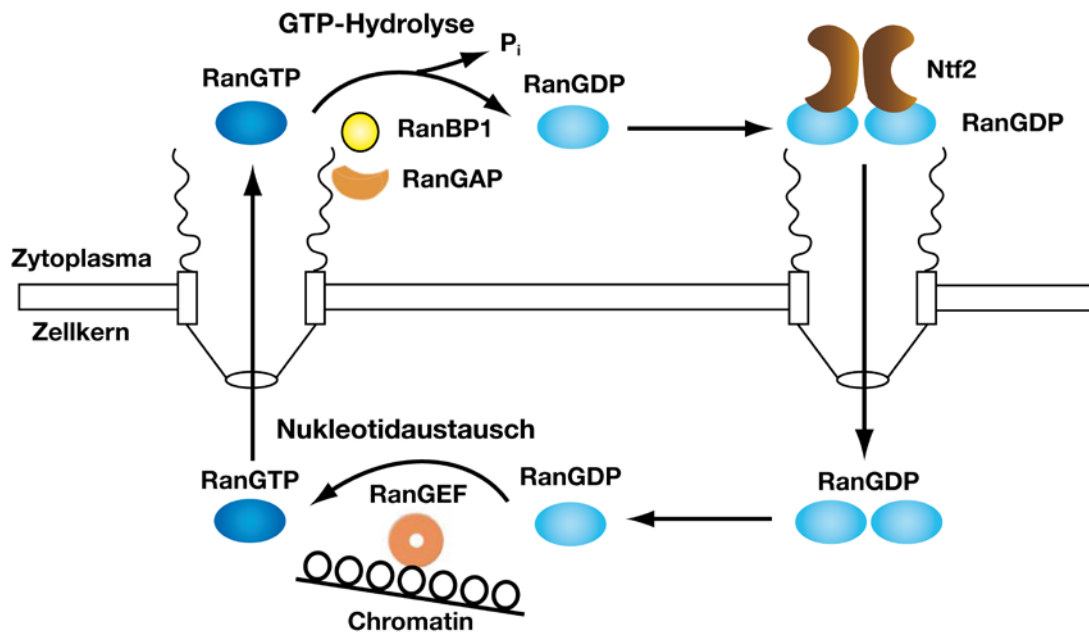


Abb. 1.4: Zyklus von RanGDP und RanGTP. Im Zytoplasma wird das an Ran gebundene GTP mit Hilfe der Proteine RanBP1 und RanGAP zu GDP und P_i hydrolysiert. Der Transportfaktor Ntf2 liegt als Dimer vor und transportiert zwei Moleküle RanGDP in den Kern. Dort bewirkt der Nukleotidaustauschfaktor RanGEF, der an das Chromatin gebunden ist, den Austausch von GDP zu GTP, womit wieder RanGTP vorliegt, das für die Aufrechterhaltung der Kerntransportprozesse benötigt wird.

RanGTP bindet im Zellkern an β -Kaps und verursacht eine Konformationsänderung, welche die Freisetzung des Cargos zur Folge hat und damit den Importvorgang beendet (Rexach & Blobel, 1995; Chook & Blobel, 1999). Komplexe aus Importin und Cargo bilden sich folglich nur, wenn eine geringe Konzentration von RanGTP vorliegt, was im Zytoplasma der Fall ist. Der nach dem Import eines Cargos im Zellkern vorliegende Komplex aus Importin und RanGTP wandert zurück ins Zytoplasma. Dort verdrängt RanBP1 das Importin und anschließend stimuliert RanGAP die Hydrolyse von GTP zu GDP durch Ran. Da Karyopherine eine deutlich geringere Affinität zu RanGDP haben als zu RanGTP, löst sich der Komplex auf. Damit liegt das Importin für einen neuen Transportprozess wieder frei im Zytoplasma vor (Rexach & Blobel, 1995; Görlich & Mattaj, 1996; Izaurralde & Adam, 1998; Hieda *et al.*, 1999; Bischoff *et al.*, 2002) (Abb. 1.5A).

Für die Aufrechterhaltung der Transportprozesse ist es auch wichtig, dass Ran effizient in den Kern zurücktransportiert wird, denn bei jedem Ran-abhängigen Transportzyklus wird mindestens ein Ran-Molekül vom Kern ins Zytoplasma befördert. Der Transportrezeptor Ntf2, der nicht zu der Familie der Karyopherine gehört, ist für den Kernimport von Ran zuständig, indem er die GDP-gebundene Form von Ran im Zytoplasma bindet und auch mit den FXFG-Motiven von Nukleoporinen interagiert. Im

Kern stimuliert RanGEF den Austausch von GDP zu GTP, wodurch die Affinität von Ran zu Ntf2 reduziert wird (Paschal & Gerace, 1995; Ribbeck *et al.*, 1998; Smith *et al.*, 1998) (Abb. 1.4).

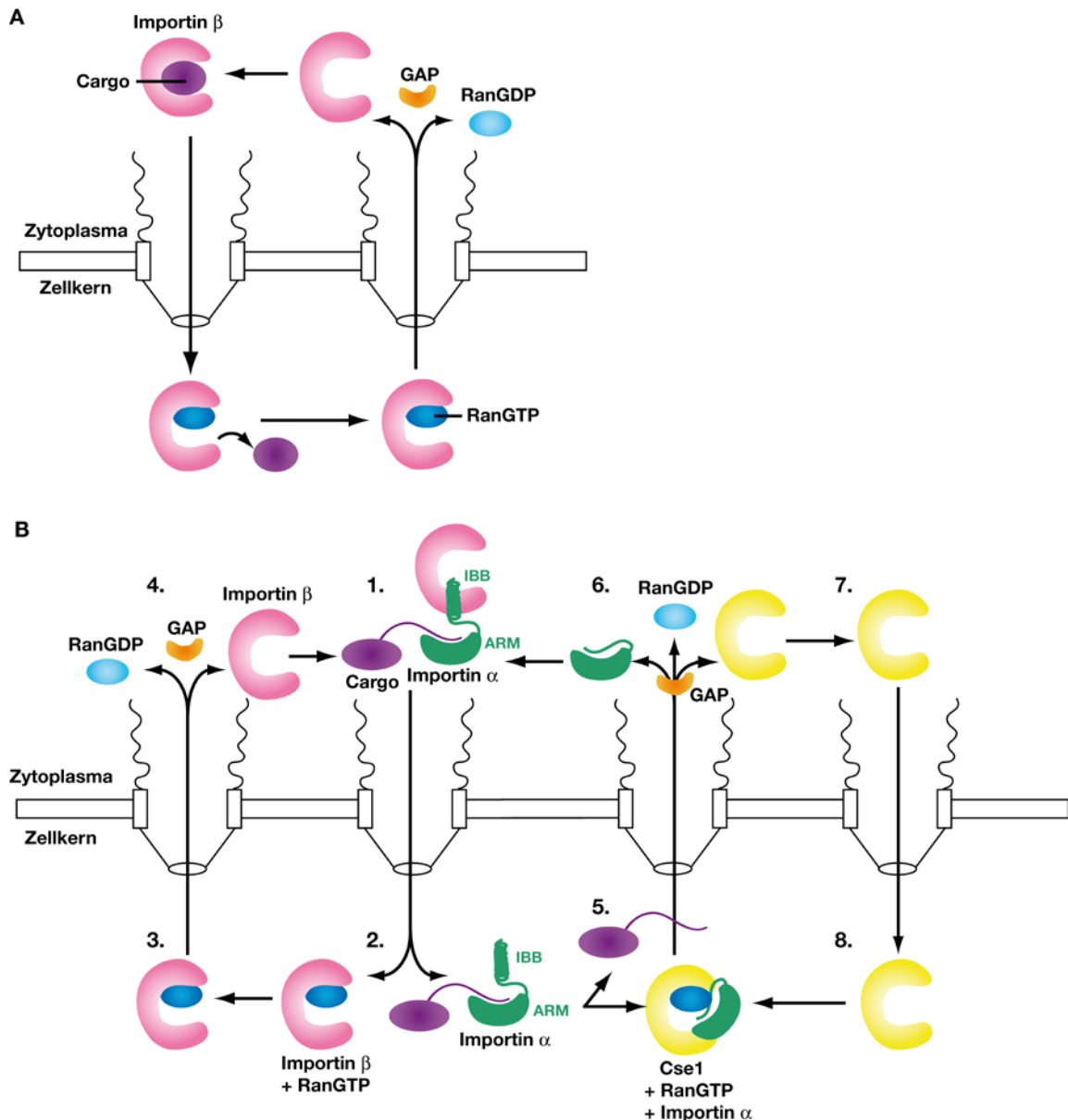


Abb. 1.5: Kernimportzyklen. A) Kernimport eines Cargos durch Importin β. Im Zytoplasma bildet sich der Komplex aus Importin β (pink) und dem Cargo (violett), der durch die Kernpore in den Zellkern gelangt. Dort interagiert RanGTP (blau) mit dem Karyopherin, was zur Freisetzung des Cargos führt. Das nun an RanGTP gebundene Importin wandert zurück ins Zytoplasma, wo RanGAP (orange) die Hydrolyse von GTP zu GDP stimuliert und schließlich das Importin wieder frei vorliegt. B) Kernimport eines Cargos (violett) durch das Importin α/β-Heterodimer (grün/pink). Der trimere Komplex aus Importin α, β und dem Cargo (1) gelangt in den Kern. Durch Interaktion von RanGTP (blau) mit Importin β verliert dieses seine Affinität zu dem Komplex (2) und wird wie unter A) beschrieben recycled (3 und 4). Das Exportin Cse1 (gelb) interagiert mit Importin α und RanGTP, wodurch das Cargo freigesetzt wird (5). Importin α wird durch Cse1 ins Zytoplasma exportiert. RanGAP stimuliert die Hydrolyse von GTP zu GDP durch Ran, wodurch Cse1 von seinem Cargo Importin α gelöst wird (6). Das Exportin Cse1 wandert schließlich zurück in den Zellkern (7 und 8).

Beim Kernexport verhält es sich so, dass im Zellkern ein trimerer Komplex aus Exportin, Cargo und RanGTP gebildet wird, der ins Zytoplasma wandert. Hier ist also RanGTP für die Bildung des Komplexes erforderlich. Im Zytoplasma bewirkt die durch RanGAP und RanBP1 stimulierte GTP-Hydrolyse die Dissoziation des Komplexes (Richards *et al.*, 1997; Steggerda & Paschal, 2002). Verändert man den GTP-GDP-Gradienten über die Kernhüllmembran in einer Zelle künstlich, z. B. durch Zugabe von zytoplasmatischem RanGTP, dann transportieren Exportine ihre Cargos vom Zytoplasma in den Zellkern. Man kann also die Transportrichtung der Karyopherine ändern, indem man den RanGTP-Gradienten ändert (Nachury & Weis, 1999). Dies verdeutlicht einerseits, dass die Direktionalität des Transportes vom RanGTP/RanGDP-Gradienten abhängt und andererseits, dass die NPCs dabei keine Rolle spielen.

Der Transportzyklus von durch Importin α/β -Heterodimere gebundenen Cargos ist komplexer als der von direkt durch Importin β gebundenen Proteinen (Abb. 1.5B). Hier bindet nach der Translokation in den Zellkern ebenfalls RanGTP an das β -Karyopherin und bewirkt eine Konformationsänderung. Damit löst sich das Protein von dem Cargo-gebundenen Importin α . In Abwesenheit von Importin β konkurriert die IBB-Domäne von Importin α mit dem Cargo um die NLS-Bindestelle. Daher kommt es zur Freisetzung des transportierten Proteins (Kobe, 1999). Um schließlich das Importin α -Molekül zurück ins Zytoplasma zu transportieren, wird das Transportprotein Cse1 benötigt, welches RanGTP gebunden hat. Nach der Translokation ins Zytoplasma bewirken RanGAP und RanBP1 die Hydrolyse von GTP zu GDP, was die Dissoziation von Cse1, Importin α und RanGDP zur Folge hat, womit auch dieser Zyklus geschlossen wäre (Abb. 1.5B) (Kutay *et al.*, 1997; Künzler & Hurt, 1998; Solsbacher *et al.*, 1998).

Der Kerntransport kann entgegen der bestehenden Konzentrationsgradienten ablaufen. Dies erfordert jedoch Energie. Bei jedem Transportvorgang wird ein Molekül GTP zu GDP hydrolysiert. Der klassische Importmechanismus mittels des Importin α/β -Dimers erfordert die Hydrolyse von zwei GTP-Molekülen, denn wie oben beschrieben muss Importin α separat ins Zytoplasma zurücktransportiert werden, was ein weiteres Molekül RanGTP erfordert (Macara, 2001).

Die Energie wird also für die Freilassung der Cargos nach dem Transportprozess und das Recycling der Rezeptoren benötigt. Der Mechanismus der Translokation von Karyopherinen (inklusive ihrer Cargos) durch die NPCs erfordert jedoch keine Energie.

NPCs enthalten keine Motorproteine und es konnte gezeigt werden, dass leere Transportrezeptoren unabhängig von NTP-Hydrolyse effizient zwischen Kern und Zytoplasma hin-und-her-wandern können (Schwoebel *et al.*, 1998; Englmeier *et al.*, 1999; Ribbeck *et al.*, 1999). Für die Passage durch die Kernpore ist die Interaktion der Transportrezeptoren mit den FG-Nups erforderlich und diese ist energieunabhängig. Daher kann man die Translokation als eine erleichterte Diffusion mittels Carrier-Proteine bezeichnen, da im Gegensatz zum aktiven Transport hier für den Prozess selber keine Energie aufgewendet werden muss, sondern nur für die Freisetzung des transportierten Moleküls am Zielort. Im Unterschied zum Import in Mitochondrien, ist bei der Translokation durch den NPC keine Entfaltung der Proteine erforderlich, mit Ausnahme von sehr großen Ribonukleoproteinen, welche partiell entfaltet werden (Daneholt, 1997). Es wurde berechnet, dass die maximale Transportrate bei ca. 80 MDa pro NPC pro Sekunde liegt. Dies entspricht etwa 800 Translokationen eines 100 kDa großen Proteins durch einen NPC pro Sekunde (Ribbeck & Görlich, 2001).

Darüber, wie der Prozess der Translokation durch den NPC funktioniert, gibt es verschiedene Hypothesen, von denen hier zwei kurz beschrieben werden. Das „Brownian affinity gating“-Modell besagt, dass die Cargo-Carrier Komplexe mit peripheren Nups interagieren und damit zur Pore gelangen. Durch die Brown'sche Molekularbewegung diffundieren sie dann durch die Pore, wobei sie transiente Interaktionen mit den Nups eingehen (Rout *et al.*, 2000). Das Hydrogel-Modell hingegen beschreibt die Kernpore als ein molekulares Geflecht aus Nups, die über ihre FG-Motive miteinander interagieren und somit ein komplexes Netzwerk bilden. Die Maschenweite dieses Geflechts (ca. 2,6 nm) und der hydrophobe Charakter stellen eine Art Sieb und selektive Phase für Moleküle dar. Da die Transportrezeptoren mit den Nups interagieren können, sind sie in der Lage, die Maschen transient zu öffnen und durch das Netzwerk zu diffundieren, während inerte Moleküle zurückgehalten werden (Ribbeck & Görlich, 2001; Frey & Görlich, 2009; Mohr *et al.*, 2009).

1.2.6 Regulation des Kerntransportes

Der nukleozytoplasmatische Transport ist ein entscheidender zellulärer Prozess, der reguliert werden kann und damit an der Steuerung von Signaltransduktion, Genexpression und schließlich Entwicklungsprozessen beteiligt ist. Die Regulation kann auf verschiedenen Ebenen des Transportprozesses stattfinden, nämlich auf Ebene der einzelnen Cargo-Moleküle, auf Ebene der Transportrezeptoren und auf der Ebene der Kernporenkomplexe. Die Cargo-Moleküle können posttranslational modifiziert werden, z. B. durch Phosphorylierung, Ubiquitinierung oder Methylierung. Ein gut untersuchtes Beispiel ist der Transkriptionsfaktor Pho4 aus *S. cerevisiae*, der Gene des Phosphatstoffwechsels reguliert. Wenn sich die Zellen in phosphatreichem Medium befinden, ist Pho4 phosphoryliert und im Zytoplasma lokalisiert. Herrscht jedoch Phosphatmangel, liegt Pho4 unphosphoryliert vor und wird durch das Karyopherin Pse1 in den Kern transportiert, da es nur in diesem Zustand eine ausreichende Affinität zu dem Transportrezeptor hat (Kaffman *et al.*, 1998). Auch die subzelluläre Lokalisierung der Transkriptionsregulatoren NF-AT (aus Säugerzellen), sowie Mig1, Swi5 und Swi6 (aus *S. cerevisiae*) wird durch Phosphorylierung reguliert und zwar in Abhängigkeit der Zellzyklusphase oder extrazellulärer Signale (Moll *et al.*, 1991; Sidorova *et al.*, 1995; Beals *et al.*, 1997; De Vit *et al.*, 1997). Das Ubiquitin-konjugierende Enzym UbcM2 wird nur in den Kern transportiert, wenn es mit Ubiquitin beladen ist, womit sichergestellt wird, dass nur funktionelle Enzyme in den Zellkern gelangen (Plafker *et al.*, 2004). Ein Beispiel für die Maskierung von NLSs ist das in Säugerzellen vorkommende NF- κ B Heterodimer p65-p50, welches durch den Inhibitor I κ B α gebunden und dadurch im Zytoplasma gehalten wird. Infolge proinflammatorischer Stimuli wird der Inhibitor degradiert und die NLS von NF- κ B für die Transportmaschinerie zugänglich (Huxford *et al.*, 1998; Jacobs & Harrison, 1998; Poon & Jans, 2005).

Regulation des Kerntransportes auf Ebene der Transportrezeptoren ist vor allem bei höheren Eukaryoten in Zusammenhang mit Entwicklungsprozessen und Krankheiten bekannt. In *Drosophila melanogaster* reguliert die gewebespezifische Expression von drei α -Kaps den Kernimport der entsprechenden Cargos während der Gametogenese und frühen Embryogenese (Goldfarb *et al.*, 2004). Die Deregulation der Karyopherin-expression, z. B. die Überexpression von Importin α 2 und dem Exportin CAS wurde in Melanom- und Krebszellen nachgewiesen (Wellmann *et al.*, 2001; Dahl *et al.*, 2006;

Winnepenninckx *et al.*, 2006).

Die Verteilung von NPC-assoziierten Proteinen im Zellkern von *S. cerevisiae* ist nicht gleichmäßig. Dies deutet darauf hin, dass einzelne NPCs spezialisierte Transportfunktionen haben könnten (Galy *et al.*, 2004). Des Weiteren kommt es während des Zellzyklus zu Änderungen der NPC-Struktur, indem verschiedene Nups phosphoryliert werden. So ändert die Relokalisierung von Nup53 die Bindestellen für das Karyopherin Pse1, mit direkten Konsequenzen für den Kerntransport dessen Cargos (Makhnevych *et al.*, 2003). Möglicherweise kann die Permeabilität der Kernporen auch reguliert werden, indem sich die NPCs weiten oder verengen. Elektronenmikroskopische Studien haben gezeigt, dass es NPCs mit verschiedenen Durchmessern und Strukturen gibt. Es ist jedoch unklar, ob es sich dabei auch um Assemblierungs-intermediate handeln könnte (Akey, 1995; Kiseleva *et al.*, 1998; Hinshaw & Milligan, 2003; Beck *et al.*, 2004).

1.3 Tec1 – Struktur und Funktion

1.3.1 Die TEAD-Familie der Transkriptionsfaktoren

Der Transkriptionsfaktor Tec1 aus *S. cerevisiae* enthält eine evolutionär konservierte DNA-Bindedomäne, die als TEA- (**TEF-1**, **Tec1** und **AbaA**) oder ATTS- (**AbaA**, **TEF-1**, **Tec1** und **Scalloped**) Motiv bezeichnet wurde (Andrianopoulos & Timberlake, 1991; Bürglin, 1991). Die hohe Sequenzähnlichkeit der DNA-Bindedomänen homologer Transkriptionsfaktoren aus verschiedenen eukaryotischen Organismen wurde zeitgleich von zwei Arbeitsgruppen entdeckt, daher existieren zwei Bezeichnungen für diese Art von DNA-Bindedomäne, wobei das Akronym TEA-Domäne (TEAD) der geläufigere Begriff ist. Die TEA-Domäne befindet sich normalerweise in der N-terminalen Hälfte der Proteine und ist 66–68 Aminosäuren lang.

TEAD-Transkriptionsfaktoren wurden bisher von den Pilzen bis hin zum Menschen in vielen Organismen gefunden (Abb. 1.6A). Sie sind generell an zellulärer Differenzierung bzw. verschiedenen Entwicklungsprozessen beteiligt und spielen oft eine Rolle bei der Transkription von viralen Genen. Das Protein Tec1 aus *S. cerevisiae* wurde ursprünglich als *trans*-aktivierender Faktor der Expression von Ty1-Retrotransposons und Ty1-vermittelter Genaktivierung identifiziert (Laloux *et al.*, 1990). Später konnte man Tec1 auch eine zelluläre Funktion zuordnen, nämlich die Aktivierung des filamentösen Wachstums von Hefezellen (Gavrias *et al.*, 1996).

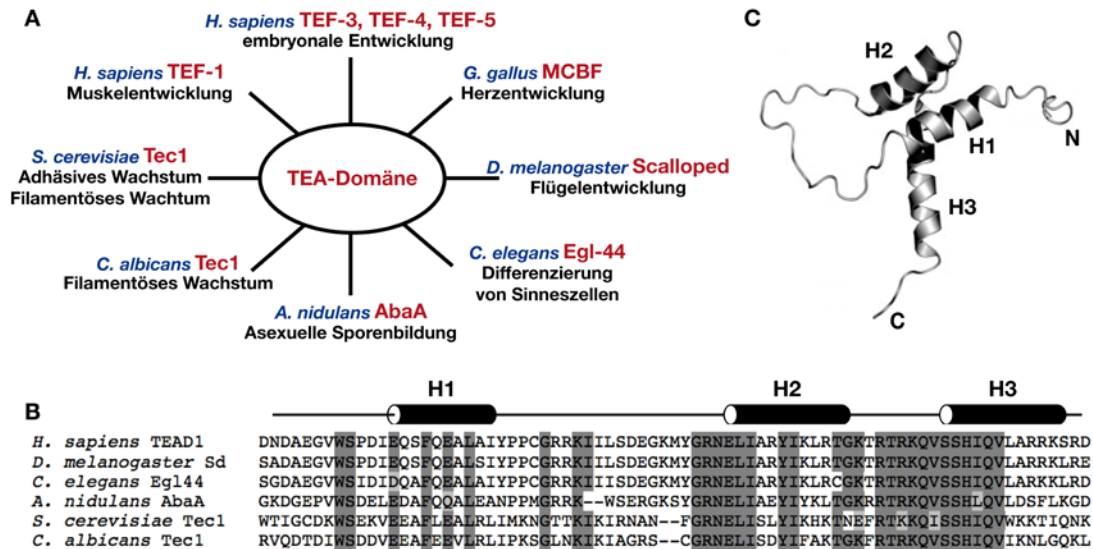


Abb. 1.6: TEAD-Transkriptionsfaktoren. A) TEAD-Proteine aus verschiedenen Modellorganismen und ihre Funktion. B) Sequenzvergleich der TEAD-Domänen aus verschiedenen Organismen. Grau hinterlegte Bereiche kennzeichnen stark konservierte Regionen, Aminosäuren mit hoher Ähnlichkeit sind hellgrau markiert. C) NMR-Struktur der TEAD-Domäne von TEF-1, bestehend aus drei Helices (H1, H2 und H3) (Anbanandam *et al.*, 2006).

Das Tec1-Protein aus *Candida albicans* ist ebenfalls für das filamentöse Wachstum und damit auch für die Virulenz verantwortlich (Schweizer *et al.*, 2000). Das Protein AbaA aus *Aspergillus nidulans* spielt eine Rolle bei der asexuellen Sporenbildung (Mirabito *et al.*, 1989). Im Fadenwurm *Caenorhabditis elegans* reguliert das TEAD-Protein Egl-44 die Differenzierung von Sinneszellen (Wu *et al.*, 2001). Das homologe Protein in *Drosophila melanogaster* heißt Scalloped und ist an der Entwicklung der Flügel, sowie an der Differenzierung von Sinnesorganen beteiligt (Campbell *et al.*, 1992; Halder *et al.*, 1998; Guss *et al.*, 2001). In *Gallus gallus* wurde der M-CAT Bindefaktor (MCBF) als TEAD-Protein identifiziert, der bei der Herzentwicklung eine wichtige Funktion hat, da er den Promotor des Troponin-Gens in Herzmuskelzellen aktiviert, indem er an so genannte M-CAT-Motive bindet (Farrance *et al.*, 1992). Im Menschen gibt es vier verschiedene TEAD-Proteine, TEF-1, TEF-3, TEF-4 und TEF-5, die an unterschiedlichen Entwicklungsprozessen beteiligt sind. TEF-1 reguliert die Entwicklung von Muskeln (Herz-, Skelett- und glatte Muskulatur) (Mar & Ordahl, 1990; Farrance & Ordahl, 1996; Hsu *et al.*, 1996), es spielt jedoch auch eine Rolle bei der Transkription viraler Gene, z. B. des SV40-Virus (Xiao *et al.*, 1991). TEF-3 wird hauptsächlich in Lunge und Leber exprimiert, während TEF-5 in Plazentazellen zu finden ist (Jiang *et*

al., 1999). TEF-4 ist für die neuronale Entwicklung von Embryos wichtig (Milewski *et al.*, 2004).

Die Aminosäuresequenzen der TEA-Domänen sind zwischen den verschiedenen Proteinen stark konserviert (44–99 %) (Bürglin, 1991; Campbell *et al.*, 1992) (Abb. 1.6B). Außerhalb der DNA-Bindedomäne findet man keine signifikanten Sequenzähnlichkeiten, jedoch sind verschiedene Beispiele bekannt, die eine funktionelle Konservierung der Proteine zeigen: TEF-1 kann die Funktion von Scalloped in *Drosophila melanogaster* während der Flügelentwicklung übernehmen (Deshpande *et al.*, 1997) und Tec1 aus *Candida albicans* komplementiert das filamentöse Wachstum von *S. cerevisiae* in *tec1*-Deletionsmutanten (Schweizer *et al.*, 2000).

TEA-DNA-Bindedomänen erkennen und binden kurze DNA-Motive, die als TCS (TEA consensus sequence) bezeichnet werden. Bekannt sind die Bindemotive von *S. cerevisiae* Tec1, *Aspergillus nidulans* AbaA, *Gallus gallus* MCBF und *Homo sapiens* TEF-1 und sie entsprechen der Konsensussequenz CATTCC bzw. CATTCT (Hwang *et al.*, 1993; Andrianopoulos & Timberlake, 1994; Stewart *et al.*, 1994; Baur *et al.*, 1997; Madhani & Fink, 1997).

Von TEF-1 wurde die Struktur der TEA-Domäne durch NMR-Analyse aufgeklärt (Anbanandam *et al.*, 2006). Sie bildet eine globuläre Struktur, die aus drei Helices (H1–H3) besteht (Abb. 1.6C). H1 und H2 sind beinahe antiparallel zueinander, mit einem Winkel von 36°. H3 liegt zwischen den anderen beiden Helices und steht in einem Winkel von ca. 100° zu H1 bzw. H2. Die Oberfläche der TEA-Domäne enthält eine hydrophobe Region an der Kontaktfläche zwischen H1 und H2, die eine mögliche Proteininteraktionsfläche darstellt. H3 wurde als die Helix identifiziert, welche die DNA erkennt und bindet. Generell handelt es sich um ein Helix-Turn-Helix Motiv, das der Struktur des Homöodomänenproteins MatA1 ähnelt. Allerdings bestehen auch deutliche Unterschiede zwischen TEA-Domänen und Homöodomänen. Die Aminosäuresequenz der TEAD unterscheidet sich stark von der Homöodomänen-Konsensussequenz, TEAD-Transkriptionsfaktoren können nicht mit Homöodomänenproteinen komplementiert werden und die DNA-Motive, die erkannt werden, sind ebenfalls unterschiedlich (Anbanandam *et al.*, 2006).

1.3.2 Die Funktionen von *Tec1* in *S. cerevisiae*

Der Transkriptionsfaktor *Tec1* ist für die Aktivierung von Genen des filamentösen Wachstums von Bedeutung. Dieses wird über verschiedene Signalwege eingeleitet, unter anderem über die Fus3/Kss1-MAP-Kinase-Signaltransduktionskaskade (Mitogen-aktivierte Protein-Kinase), an deren Ende der Transkriptionsfaktor *Tec1* steht (Roberts & Fink, 1994). Bei diploiden Zellen wird das Pseudohyphenwachstum durch Stickstoffmangel ausgelöst, bei haploiden Zellen spielen wahrscheinlich ebenfalls Nährstoffsignale eine Rolle. Ein mögliches Signal für das haploid adhäsive Wachstum ist Glukosemangel (Cullen & Sprague, 2000). Sensorische Funktion haben der Osmolaritäts-Rezeptor Sho1 und der Mucin-Rezeptor Msb2. (Cullen *et al.*, 2004). Das Signal wird über die GTPase Cdc42 an eine Reihe von MAP-Kinasen weitergeleitet, die sequenziell phosphoryliert werden. Dabei handelt es sich um die Kinasen Ste20 (MAPKKKK), Ste11 (MAPKKK), Ste7 (MAPKK) und schließlich Kss1 (MAPK) (Cook *et al.*, 1997; Madhani *et al.*, 1997; Sabbagh *et al.*, 2001). Während inaktives (unphosphoryliertes) Kss1 in Zusammenspiel mit den Inhibitoren Dig1 und Dig2 den Transkriptionsfaktor Ste12 bindet und diesen inhibiert, bewirkt die Phosphorylierung von Kss1, dass der Komplex gelöst wird und Ste12 seine Funktion erfüllen kann (Cook *et al.*, 1996; Cook *et al.*, 1997; Tedford *et al.*, 1997). Ste12 aktiviert unter anderem die Expression des *TEC1*-Gens (Madhani & Fink, 1997). Die Transkriptionsfaktoren *Tec1* und Ste12 bewirken schließlich die Aktivierung der Gene, deren Produkte beim filamentösen Wachstum eine Rolle spielen (Gavrias *et al.*, 1996).

Die meisten Komponenten dieses Signalweges werden auch für die Weiterleitung von Pheromonsignalen, die zur Konjugation zweier Hefezellen führt, verwendet. Es handelt sich dabei um die GTPase Cdc42, die MAP-Kinasen Ste20, Ste11 und Ste7 und den Transkriptionsfaktor Ste12 (Liu *et al.*, 1993; Mösch *et al.*, 1996). Die finale MAP-Kinase ist hier Fus3. Sie aktiviert einerseits Ste12, hemmt aber auf der anderen Seite das filamentöse Wachstum, indem sie *Tec1* phosphoryliert und damit das Protein für den Abbau markiert (Brückner *et al.*, 2004). Beim pheromoninduzierten Signalweg spielt das Gerüstprotein Ste5 eine Rolle, welches die Komponenten der MAPK-Kaskade zusammenhält (Choi *et al.*, 1994). Um die Signalspezifität der beiden Signalwege zu gewährleisten sind auch Stärke und Dauer der auslösenden Signale von Bedeutung, denn Pheromone stellen ein starkes, aber transientes Signal dar, während Nährstoffbedingungen ein schwaches Signal darstellen, das jedoch über längere Zeit andauert (Brückner *et al.*, 2004).

Tec1 erkennt und bindet TCS-Motive in den Promotorregionen verschiedener Zielgene, die am filamentösen Wachstum beteiligt sind. Dabei kann Tec1 sowohl alleine, als auch als Heterodimer mit dem Transkriptionsfaktor Ste12 die Transkription aktivieren. Bei der so genannten kombinatorischen Kontrolle von Tec1 und Ste12 binden die beiden Transkriptionsfaktoren an FRE-Motive (filamentation response elements) in den Promotorregionen bestimmter Zielgene. Ein FRE besteht aus einem TCS-Element und einem Ste12-Bindemotiv (pheromone responsive element, PRE). Man kann jedoch auch an Promotoren, die nur TCSs enthalten Tec1-Ste12-Heterodimere finden, bei denen dann nur Tec1 mit der DNA interagiert (Baur *et al.*, 1997; Madhani & Fink, 1997; Köhler *et al.*, 2002; Heise *et al.*, 2010).

Die durch Tec1 regulierten Zielgene kann man in zwei Klassen einteilen. Die eine Klasse umfasst Gene, bei denen Tec1 nur gemeinsam mit Ste12 seine Funktion erfüllen kann (Heise *et al.*, 2010). Hierzu gehören z. B. *FUS2*, *FIG1*, *PGU1* und *AGA1*. Fus2 und Fig1 spielen bei der Konjugation eine Rolle, Pgu1 ist eine Endo-Polygalakturonase und Aga1 ist eine Agglutinin-Untereinheit. Die zweite Klasse enthält Gene, bei denen Tec1 unabhängig von Ste12 wirken kann. Beispiele hierfür sind *FLO11*, *HXK1*, *HSP30* und *TIP1* (Heise *et al.*, 2010). Flo11 ist ein Oberflächenflokkulin, das für adhäsives Wachstum benötigt wird, bei Hxk1 handelt es sich um eine Hexokinase, Hsp30 ist ein Hitzeschockprotein und Tip1 ein Mannoprotein in der Zellwand mit potentieller Lipaseaktivität.

1.3.3 Die Domänenstruktur von Tec1

S. cerevisiae Tec1 ist 486 Aminosäuren lang und besitzt verschiedene Domänen. In der N-terminalen Hälfte, im Bereich der Aminosäuren 125–199, befindet sich die bereits beschriebene TEA-DNA-Bindedomäne (Bürglin, 1991). Sie weist eine Sequenzidentität von 44 % zu TEF-1 und zu AbaA auf, bei näher verwandten Organismen ist die Homologie jedoch größer, z. B. zu *Candida albicans* Tec1 (66 %) (Bürglin, 1991; Schweizer *et al.*, 2000). Die N-terminale Hälfte von Tec1 (Aminosäuren 1–280) ist notwendig und hinreichend für die Interaktion mit der MAP Kinase Fus3 (Brückner *et al.*, 2004). Ein ähnlicher Bereich (Aminosäuren 1–257) ist für die Genaktivierung über FREs erforderlich und hinreichend (Köhler *et al.*, 2002). In der C-terminalen Hälfte des Proteins ist der Bereich der Aminosäuren 300 bis 400 für die Interaktion mit dem Transkriptionsfaktor Ste12 notwendig, jedoch vermutlich nicht hinreichend (Chou *et al.*, 2006). Da die N-terminale Hälfte von Tec1 jedoch für die kombinatorische

Genregulation von Tec1 und Ste12 über ein FRE hinreichend ist, deutet dies darauf hin, dass keine direkte Interaktion zwischen Tec1 und Ste12 für die FRE-Aktivierung erforderlich ist und jeder Transkriptionsfaktor sein DNA-Motiv einzeln binden kann (Köhler *et al.*, 2002). Des Weiteren konnte vor Kurzem gezeigt werden, dass Tec1 am C-terminalen Ende eine eigene Aktivierungsdomäne besitzt (Aminosäuren 377–486) (Heise *et al.*, 2010).

1.4 Ziele dieser Arbeit

Kerntransportvorgänge spielen in eukaryotischen Zellen eine wichtige Rolle bei den zellulären Prozessen. Die Transkriptionsfaktoren Tec1 und Ste12, die für das filamentöse Wachstum von *S. cerevisiae* notwendig sind, lokalisieren im Zellkern um dort ihre Funktion zu erfüllen. Von Ste12 ist bekannt, dass es von dem Importin Pse1 in den Kern transportiert wird und der Bereich der NLS wurde auf das C-terminale Ende des Proteins eingegrenzt (Aminosäuren 494–688) (Leslie *et al.*, 2002). Von Tec1 ist hingegen nichts über dessen Kernimport bekannt. Das Hauptziel dieser Arbeit war es daher, die Kernlokalisierungssignale in Tec1 zu identifizieren und zu charakterisieren, sowie die am Import von Tec1 beteiligten Karyopherine zu bestimmen. Auch über andere Proteine der TEAD-Familie ist so gut wie nichts bezüglich des Kerntransportes bekannt. Da die Kerntransportmaschinerie zwischen niederen und höheren Eukaryoten stark konserviert ist, können anhand der Informationen über Tec1 mögliche Rückschlüsse auf den Import verwandter Proteine gezogen werden. Durch diese Arbeit soll das Wissen über Kernlokalisierungssignale erweitert werden, um die Entstehung dieser Signale besser zu verstehen und möglicherweise bisher unbekannte NLSs in Proteinen durch Sequenzvergleich zu identifizieren. Schließlich sollte mit dieser Arbeit das generelle Verständnis von spezifischen Importin-Cargo-Interaktionen erweitert werden.

2. Ergebnisse

2.1 Identifizierung und Charakterisierung der Kernlokalisierungssignale von Tec1

2.1.1 Tec1 enthält eine Sequenz, die einer bekannten NLS sehr ähnlich ist, die jedoch nicht hinreichend für die Kernlokalisierung ist

Bei keinem Transkriptionsfaktor der TEAD-Familie wurde bisher eine genaue Analyse des Kernimportmechanismus durchgeführt. Nur für das Protein Scalloped aus *Drosophila melanogaster* ist bekannt, dass die TEA-Domäne hinreichend für die Kernlokalisierung ist und in diesem Bereich eine Sequenz zu finden ist, die Ähnlichkeit mit der bipartiten klassischen NLS hat (Srivastava *et al.*, 2002) (Tabelle 2). Da viele bekannte NLSs aus einer Folge von basischen Aminosäuren bestehen, wurden die Proteinsequenzen verschiedener TEAD-Proteine auf solche Motive hin untersucht (Tabelle 2).

Tabelle 2: NLS-ähnliche Sequenzen in TEAD-Proteinen

Organismus	Protein	Bereich	Sequenz
<i>Candida albicans</i>	Tec1	AS 19–23	KKGKK
<i>Aspergillus nidulans</i>	AbaA	AS 94–98	KKLRR
<i>Aspergillus nidulans</i>	AbaA	AS 186–191	KRRTRK
<i>Caenorhabditis elegans</i>	Egl-44	AS 159–170	RKKLRDEQAKKK
<i>Drosophila melanogaster</i>	Scalloped	AS 145–161	RKQVSSHIQVLARRKLR
<i>Homo sapiens</i>	TEAD1	AS 87–103	RKQVSSHIQVLARRKSR

Die fett gedruckten Aminosäuren kennzeichnen die basischen Motive der (putativen) bipartiten NLSs.

In AbaA von *Aspergillus nidulans* und Tec1 von *Candida albicans* findet man jeweils ein kurzes Motiv, das vier basische Aminosäuren enthält und der von Lange *et al.* (2007) veröffentlichten Konsensussequenz der monopartiten NLS (KK/RXK/R) entspricht. In AbaA ist weiterhin das basische Motiv KKRTRK zu finden, welches ebenfalls eine monopartite NLS darstellen könnte (Tabelle 2). Das Protein Egl-44 aus *Caenorhabditis elegans* enthält das Motiv RKKX₆KKK (Tabelle 2). Es könnte sich dabei um eine bipartite NLS handeln. Jedoch ist sie nicht mit der veröffentlichten Konsensussequenz KRX_{10–12}KRXK vereinbar (Lange *et al.*, 2007). Schließlich findet

man in Scalloped von *Drosophila melanogaster* die bereits erwähnte putative bipartite NLS, welche auch in dem Transkriptionsfaktor TEAD1 aus *Homo sapiens* vorhanden ist. Die Motive unterscheiden sich nur in einer Aminosäure voneinander und sind dem Konsensusmotiv der bipartiten NLS sehr ähnlich (Tabelle 2).

In dem Transkriptionsfaktor Tec1 aus *S. cerevisiae* findet man keine Motive, die klassischen NLSs ähnlich sind. Ein Sequenzvergleich von Tec1 mit einer neuartigen NLS, der so genannten „novel NLS“ (Fries *et al.*, 2007) zeigt eine signifikante Übereinstimmung im Bereich der Aminosäuren 344 bis 373 (Abb. 2.1). Nur die letzte Aminosäure der Konsensussequenz unterscheidet sich von der in Tec1. Statt einem Lysin- oder Argininrest findet man bei Tec1 an dieser Stelle einen Histidinrest (Abb. 2.1). Allerdings hat Histidin ähnliche Eigenschaften wie Arginin und Lysin, da alle drei Aminosäuren einen basischen Charakter haben.



Abb. 1: Sequenzvergleich der „novel NLS“ (Fries *et al.*, 2007) mit Tec1. Sequenzvergleich von Tec1 (AS 344–373) mit der Konsensussequenz der novel NLS (nNLS). Übereinstimmende Aminosäuren sind grün markiert, Aminosäuren mit ähnlichen Eigenschaften gelb, X steht für eine beliebige Aminosäure.

Die „novel NLS“ wurde in dem Transkriptionsfaktor Asr1 aus *S. cerevisiae* identifiziert und ein 38 Aminosäuren langer Bereich, der diese „novel NLS“ enthält, ist hinreichend und notwendig für die Kernlokalisierung (Fries *et al.*, 2007). Um zu untersuchen, ob der entsprechende Bereich von Tec1 auch hinreichend ist, wurden die Aminosäuren 344–373 mit GFP fusioniert und die entsprechende Nukleotidsequenz durch den *TEC1*-Promotor von einem Plasmid exprimiert (BHUM 1226) (Abb. 2.2). Als Kontrolle dienten GFP-Tec1, bei dem das gesamte Tec1 Protein an GFP fusioniert wurde (BHUM 1196) (Positivkontrolle) und freies GFP (BHUM 1156) (Negativkontrolle). GFP-Tec1 lokalisierte, wie zu erwarten war im Zellkern, während freies GFP gleichmäßig über die ganze Zelle (mit Ausnahme der Vakuole) verteilt war (Abb. 2.2).

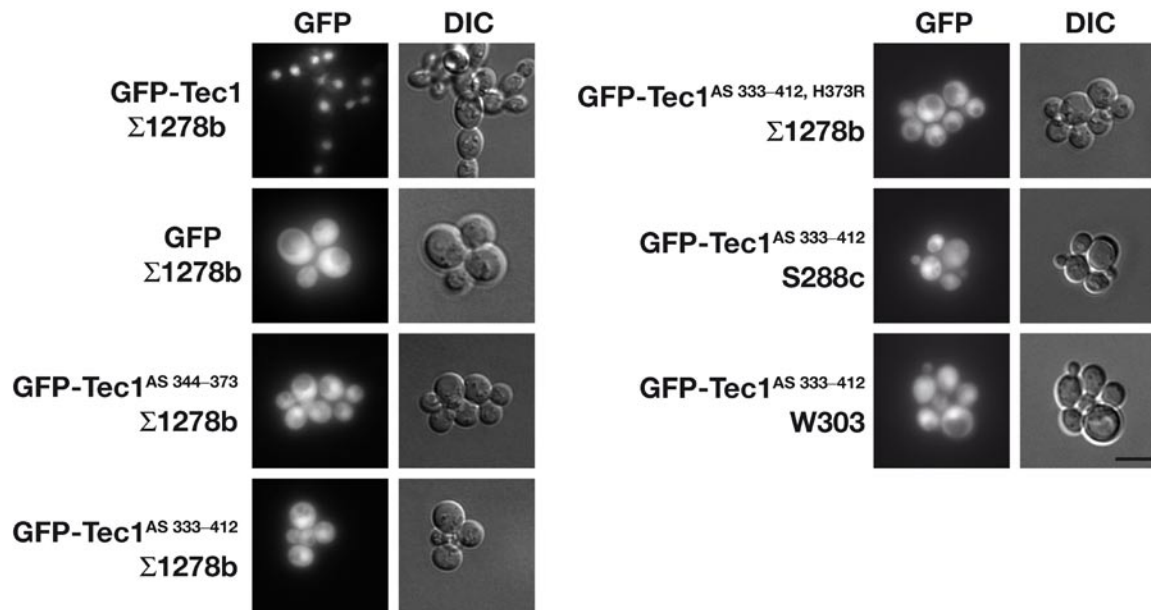


Abb. 2.2: Die durch Sequenzvergleich identifizierte putative NLS in Tec1 ist nicht hinreichend für die Kernlokalisierung. Die Konstrukte GFP-Tec1 (BHUM 1196), GFP (BHUM 1156), GFP-Tec1^{AS 344–373} (BHUM1226), GFP-Tec1^{AS 333–412} (BHUM 1225) und GFP-Tec1^{AS 333–412, H373R} (BHUM 1322) wurden in dem Stamm YHUM 0792 (*tec1Δ*, Σ 1278b) hergestellt. Das Konstrukt GFP-Tec1^{AS 333–412} (BHUM 1225) wurde zusätzlich in den Stämmen YHUM 0956 (WT, S288c) und YHUM 1041 (WT, W303) hergestellt. Die Lokalisierung der Fusionsproteine wurde im Fluoreszenzmikroskop untersucht. Zu sehen ist jeweils ein Bild der Fluoreszenz von GFP nach Anregung bei 395 nm (GFP) und das zugehörige Durchlichtbild (DIC). Der Maßstab entspricht 5 μ m.

Das Fusionsprotein GFP-Tec1^{AS 344–373} (BHUM 1226) war ebenfalls gleichermaßen in Zytoplasma und Zellkern zu finden. Der Bereich der putativen NLS ist damit nicht hinreichend für die Kernlokalisierung von Tec1. Als nächstes wurde ein größeres Fragment, GFP-Tec1^{AS 333–412} (BHUM 1225), untersucht da das erste Fusionsprotein eventuell fehlerhaft gefaltet oder ein größerer Bereich für die Funktion erforderlich sein könnte. Aber auch dieses Protein zeigte keine spezifische Kernlokalisierung (Abb. 2.2). Ein möglicher Grund, warum die putative NLS in Tec1 nicht funktionell ist, könnte die letzte Aminosäure sein, die nicht mit der Konsensussequenz übereinstimmt. Daher wurde Histidin an Position 373 durch sequenzspezifische Mutagenese zu Arginin mutiert, da sich diese Aminosäure bei den meisten Proteinen, aus denen die Konsensussequenz abgeleitet wurde, an dieser Position befindet. Das Protein GFP-Tec1^{AS 333–412, H373R} (BHUM 1322) war jedoch ebenfalls zytoplasmatisch lokalisiert. Als letztes wurde untersucht, ob der Hefestamm bei der Lokalisierung dieses Fusionsproteins eine Rolle spielt. Die bisherigen Untersuchungen dieser Arbeit wurden in dem Hefestamm Σ 1278b durchgeführt, da Tec1 eine Rolle beim adhäsiven Wachstum

von Hefezellen spielt und dieses Phänomen normalerweise in diesem Stammhintergrund untersucht wird. Die Lokalisierung des Proteins Asr1 in der Veröffentlichung Fries *et al.* (2007) wurde in dem Stamm W303 durchgeführt. Aus diesem Grund wurde das Fusionsprotein GFP-Tec1^{AS 333–412} (BHUM 1225) auch in einem Stamm mit dem Hintergrund W303 und zusätzlich in einem Stamm mit dem Hintergrund S288c hergestellt. Aber auch in diesen Hefestämmen war keine vollständige Kernlokalisierung des Fusionsproteins zu beobachten (Abb. 2.2).

2.1.2. Der Transkriptionsfaktor Tec1 enthält zwei Bereiche, die Kernlokalisierung vermitteln

Da durch die bioinformatische Analyse des Tec1-Proteins keine funktionelle NLS identifiziert werden konnte, wurde ein experimenteller Ansatz gewählt, um die Bereiche des Proteins zu finden, die eine Kernlokalisierung vermitteln. Dazu wurden verschiedene Fragmente des Proteins an GFP fusioniert. Diese Fusionsproteine wurden auf einem Plasmid codiert und in den Hefestamm YHUM 1889 (*tec1Δ*, *NUP49::tagRFP*) eingebracht, in dem das Nukleoporin Nup49 als RFP-Fusionsprotein hergestellt wird. Durch dieses Fluoreszenzsignal kann die Position des Zellkerns in den einzelnen Zellen bestimmt werden. Die Zellen wurden jeweils in Niedrigfluoreszenzmedium bis zur exponentiellen Phase herangezogen und dann im Fluoreszenzmikroskop untersucht. Ein Teil der Konstrukte wurde in der von mir betreuten Bachelorarbeit von Anja Drabig hergestellt (Drabig, 2007).

Zunächst wurde sowohl die N-terminale als auch die C-terminale Hälfte von Tec1 an GFP fusioniert: GFP-Tec1^{AS 1–240} (BHUM 1197) und GFP-Tec1^{AS 241–486} (BHUM 1198) (Abb. 2.3, Nr. 3 und 4). Interessanterweise zeigten beide Fragmente eine Kernlokalisierung. Da sie keine überlappenden Bereiche haben, lässt sich daraus schließen, dass es in Tec1 zwei Regionen gibt, die Kernlokalisierung vermitteln. Tec1 enthält also zwei putative NLSs, die im Folgenden als NLS1 und NLS2 bezeichnet werden. Als nächstes wurden vier Fragmente konstruiert, die um jeweils 10–20 Aminosäuren überlappen: GFP-Tec1^{AS 1–122} (BHUM 1199), GFP-Tec1^{AS 110–270} (BHUM 1200), GFP-Tec1^{AS 253–412} (BHUM 1201) und GFP-Tec1^{AS 395–486} (BHUM 1202) (Abb. 2.3, Nr. 5–8). Die Bereiche von Aminosäure 1–122 (BHUM 1199) und Aminosäure 395–486 (BHUM 1202) waren nicht hinreichend für Kernlokalisierung, während die Fragmente von Aminosäure 110–270 (BHUM 1200) und Aminosäure 253–412 (BHUM 1201) jeweils eine ähnlich starke

Kernlokalisierung wie die Konstrukte GFP-Tec1^{AS 1-240} (BHUM 1197) bzw. GFP-Tec1^{AS 241-486} (BHUM 1198) zeigten. Mit Hilfe der Formel $(N-C)/(N+C) \times 100$ kann die Relation der Fluoreszenzintensität im Kern (N) zu der im Zytoplasma (C) berechnet werden (nukleozytoplasmatische Relation) (Leclerc *et al.*, 1998). Die nach dieser Formel berechneten Werte können generell zwischen -100 und +100 liegen, wobei -100 eine Lokalisierung nur im Zytoplasma und nicht im Kern bedeutet, der Wert 0 bedeutet, dass die Verteilung zwischen Zytoplasma und Kern gleichmäßig ist und der Wert +100 spiegelt eine komplette Kernlokalisierung wider. Freies GFP akkumulierte leicht im Zellkern und hatte eine nukleozytoplasmatische Relation von 8 ± 6 (Abb. 2.3, Nr. 2). Damit ist dies der niedrigste Wert, der für die verschiedenen GFP-Tec1-Konstrukte erwartet wird und eine passive Akkumulation im Zellkern widerspiegelt. Das GFP-Tec1-Protein (BHUM 1196) war deutlich im Kern lokalisiert und die Quantifizierung ergab den Wert 55 ± 15 (Abb. 2.3, Nr. 1). Es besteht also eine deutliche Differenz zwischen freiem GFP und GFP-Tec1. Durch die Quantifizierung konnte auch ein leichter Unterschied der Lokalisierung der einzelnen GFP-Tec1-Fusionsproteine festgestellt werden. Die Fusionsproteine mit den kürzeren Tec1-Fragmenten, BHUM 1200 und 1201 (Abb. 2.3, Nr. 6 und 7) hatten einen höheren Quantifizierungswert (36 ± 9 bzw. 66 ± 10) als die Fusionsproteine mit der N- bzw. C-terminalen Hälfte von Tec1 (27 ± 8 bzw. 43 ± 10) (BHUM 1197 und 1198) (Abb. 2.3, Nr. 3 und 4).

Anhand der bisherigen Konstrukte GFP-Tec1^{AS 1-240} und GFP-Tec1^{AS 110-270} (BHUM 1197 und 1200) konnte die NLS1 auf den Bereich der Aminosäuren 110-240 eingegrenzt werden. Ein solches Konstrukt (GFP-Tec1^{AS 110-240}; BHUM 1417) lokalisierte wie erwartet im Kern (Abb. 2.3, Nr. 9). Auch GFP-Tec1^{AS 125-240} (BHUM 1415) (Abb. 2.3 Nr. 10) war kernlokalisiert, während GFP-Tec1^{AS 191-270} (BHUM 1220) (Abb. 2.3, Nr. 14) keine Anreicherung im Kern zeigte. Als nächstes wurde das Fusionsprotein GFP-Tec1^{AS 125-199} (BHUM 1217) (Abb. 2.3, Nr. 11) untersucht, bei dem nur die TEA-Domäne von Tec1 an GFP fusioniert ist. Hier zeigte sich allerdings eine unerwartete Lokalisierung, denn das Protein akkumulierte vollständig in einem kleinen Punkt in der Zelle. Dieser befand sich an der Kernperipherie, wie in Abschnitt 2.3 gezeigt wird (Abb. 2.27C). Auf dieses spezielle Phänomen wird an dieser Stelle nicht näher eingegangen, da es sich nicht um eine klassische Kernlokalisierung handelt. Da die Fusionsproteine GFP-Tec1^{AS 125-150} (BHUM 1309) (Abb. 2.3, Nr. 12) und GFP-Tec1^{AS 151-190} (BHUM 1310) (Abb. 2.3, Nr. 13) nicht mehr im Kern akkumulierten, ist

Nr.	GFP	DIC										$\frac{(N - C)}{(N + C)} \times 100$
1			GFP	1	125	TEA	199	301	Ste12 BD	400	486	55 +/- 15
										377	AD	486
2			GFP									8 +/- 6
3			GFP	1								27 +/- 8
4			GFP							241		43 +/- 10
5			GFP	1								11 +/- 6
6			GFP							110		36 +/- 9
7			GFP							253		66 +/- 10
8			GFP									10 +/- 6
										395	486	
9			GFP							110		32 +/- 11
10			GFP							125		37 +/- 10
11			GFP							125	199	96 +/- 5
12			GFP									9 +/- 9
										125 - 150		
13			GFP									9 +/- 9
										151 - 190		
14			GFP									15 +/- 7
										191	270	
15			GFP									63 +/- 12
										301	400	
16			GFP									19 +/- 7
										253	332	
17			GFP									39 +/- 11
										301	379	
18			GFP									18 +/- 7
										333	412	
19			GFP									13 +/- 7
										301 - 340		

Abb. 2.3: Tec1 enthält zwei Bereiche, die Kernlokalisierung vermitteln. Fusionsproteine, bestehend aus GFP und verschiedenen Fragmenten von Tec1, wurden von einem Plasmid durch den *TEC1*-Promotor im Stamm YHUM 1889 (*tec1Δ*, *NUP49::tagRFP*) hergestellt und ihre Lokalisierung durch Fluoreszenzmikroskopie bestimmt. Gezeigt sind jeweils ein repräsentatives Bild der GFP-Fluoreszenz nach Anregung bei 395 nm (GFP), das zugehörige Durchlichtbild (DIC), eine schematische Darstellung des Konstruktes, sowie die Quantifizierung der nukleozytoplasmatischen Relation durch die Formel $(N-C)/(N+C) \times 100$, wobei N die Fluoreszenzintensität im Zellkern und C die Intensität im Zytoplasma ist. Folgende Konstrukte wurden untersucht: 1: GFP-Tec1 (BHUM 1196), 2: GFP (BHUM 1156), 3: GFP-Tec1^{AS 1-240} (BHUM 1197), 4: GFP-Tec1^{AS 241-486} (BHUM 1198), 5: GFP-Tec1^{AS 1-122} (BHUM 1199), 6: GFP-Tec1^{AS 110-270} (BHUM 1200), 7: GFP-Tec1^{AS 253-412} (BHUM 1201), 8: GFP-Tec1^{AS 395-486} (BHUM 1202), 9: GFP-Tec1^{AS 110-240} (BHUM 1417), 10: GFP-Tec1^{AS 125-240} (BHUM 1415), 11: GFP-Tec1^{AS 125-199} (BHUM 1217), 12: GFP-Tec1^{AS 125-150} (BHUM 1309), 13: GFP-Tec1^{AS 151-190} (BHUM 1310), 14: GFP-Tec1^{AS 191-270} (BHUM 1220), 15: GFP-Tec1^{AS 301-400} (BHUM 1418), 16: GFP-Tec1^{AS 253-332} (BHUM 1224), 17: GFP-Tec1^{AS 301-379} (BHUM 1312), 18: GFP-Tec1³³³⁻⁴¹² (BHUM 1225) und 19: GFP-Tec1^{AS 301-340} (BHUM 1692). TEA = TEA-Domäne (DNA-Bindedomäne), Ste12-BD = Ste12 Bindedomäne, AD = Aktivierungsdomäne. Der Maßstab der Mikroskopiebilder entspricht 5 µm.

der Bereich der NLS1 durch die vorliegenden Konstrukte auf die Aminosäuren 110–240 (BHUM 1415) eingegrenzt worden und umfasst die gesamte DNA-Bindedomäne, die im Bereich der Aminosäuren 125–199 liegt (Bürglin, 1991).

Die NLS2 wurde durch die ersten Konstrukte im Bereich der Aminosäuren 253–412 identifiziert. Das Fusionsprotein GFP-Tec1^{AS 301-400} (BHUM 1418) (Abb. 2.3, Nr. 15) wurde als nächstes getestet. Dieser Bereich von Tec1 ist für die Interaktion mit dem Transkriptionsfaktor Ste12 notwendig (Chou *et al.*, 2006). Das Protein zeigte eine ähnlich starke Kernlokalisierung wie GFP-Tec1^{AS 253-412} (BHUM 1201). Die Quantifizierungswerte unterscheiden sich kaum voneinander (63 +/- 12 bzw. 66 +/- 10). Daher werden in den Bereichen der Aminosäuren 253–301 bzw. 400–412 keine weiteren für die Kernlokalisierung kritischen Aminosäuren erwartet. GFP-Tec1^{AS 253-332} (BHUM 1224) war nicht im Kern angereichert (Abb. 2.3, Nr. 16). Das Fusionsprotein GFP-Tec1^{AS 301-379} (BHUM 1312) (Abb. 2.3, Nr. 17) war im Kern akkumuliert, jedoch deutlich schwächer als GFP-Tec1^{AS 301-400} (BHUM 1418) (39 +/- 11 bzw. 63 +/- 12). Die 21 Aminosäuren am C-terminalen Ende des Bereiches sind also für effizienten Kerntransport notwendig. Durch weiteres Kürzen des Fragmentes zu GFP-Tec1^{AS 301-340} (BHUM 1692) ging die Funktion der NLS2 vollständig verloren, denn es war keine Akkumulation dieses Fusionsproteins im Kern zu beobachten (Abb. 2.3, Nr. 19). Auch ein Kürzen des Bereichs am N-terminalen Ende zu GFP-Tec1^{AS 333-412} (BHUM 1225) führte zum Verlust der Funktionalität der NLS, das Konstrukt war gleichmäßig in der Zelle verteilt (Abb. 2.3, Nr. 18). Die NLS2 konnte also durch die untersuchten Fusionsproteine auf den Bereich der Aminosäuren 301–400 eingegrenzt werden. Dieser Bereich

entspricht genau dem, der für die Interaktion mit dem Transkriptionsfaktor Ste12 notwendig ist.

Durch Kolokalisierung mit fluoreszenzmarkiertem Nup49-tagRFP wurde für alle Konstrukte überprüft, dass die in Abb. 2.3 gezeigten kernlokalisierten Proteine wirklich im Zellkern sind. Exemplarisch ist dies für einige der Konstrukte gezeigt (Abb. 2.4). Nup49 ist ein Nukleoporin, also ein Protein des Kernporenkomplexes, das an der Kernperipherie zu finden ist und dementsprechend eine ringförmige Lokalisierung zeigte. Die Fluoreszenz der kernlokalisierten Proteine GFP-Tec1 (BHUM 1196), GFP-Tec1^{AS 125–240} (BHUM 1415) und GFP-Tec1^{AS 301–400} (BHUM 1418) war jeweils innerhalb der durch Nup49-RFP markierten ringförmigen Struktur der Kernhülle zu finden (Abb. 2.4).

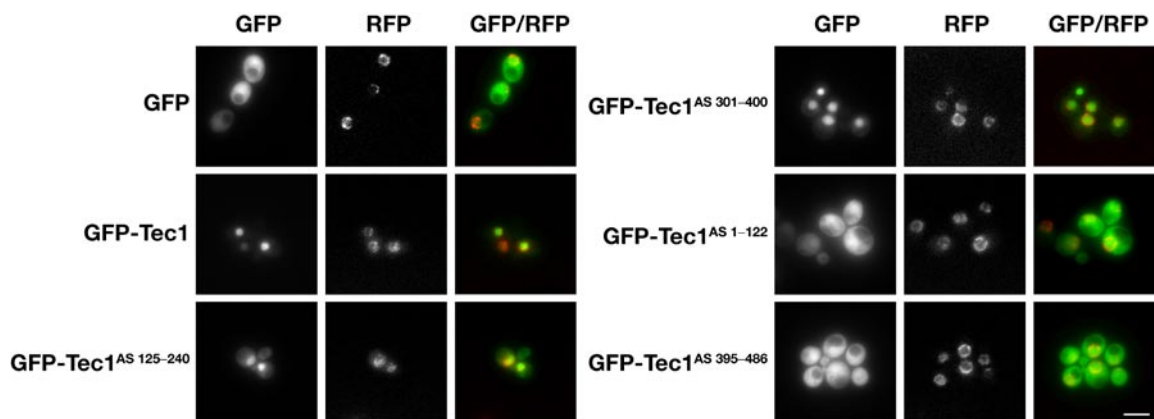


Abb. 2.4: Kolokalisierung verschiedener GFP-(Tec1)-Konstrukte mit Nup49-RFP.

Kolokalisierung von GFP (BHUM 1156), GFP-Tec1 (BHUM 1196), GFP-Tec1^{AS 125–240} (BHUM 1415), GFP-Tec1^{AS 301–400} (BHUM 1418), GFP-Tec1^{AS 1–122} (BHUM 1199) und GFP-Tec1^{AS 395–486} (BHUM 1202) mit Nup49-tagRFP in YHUM 1889 (*tec1Δ, NUP49::tagRFP*). Die Fluoreszenz der GFP-Moleküle nach Anregung bei 395 nm (GFP), die Fluoreszenz der tagRFP-Moleküle nach Anregung bei 555 nm (RFP) und die überlagerten Bilder der GFP- und RFP-Fluoreszenz (GFP/RFP) sind gezeigt. In den überlagerten Bildern sind die GFP-Fluoreszenzsignale in grün dargestellt, die RFP-Signale in rot. Der Maßstab entspricht 5 μ m.

Um zu untersuchen in welcher Menge die einzelnen GFP-Fusionsproteine in der Zelle vorliegen, wurde ein Immunoblot durchgeführt. Dazu wurden Hefezellen, welche mit den Plasmiden BHUM 1156 (GFP), BHUM 1196 (GFP-Tec1), BHUM 1197 (GFP-Tec1^{AS 1–240}), BHUM 1198 (GFP-Tec1^{AS 241–486}), BHUM 1199 (GFP-Tec1^{AS 1–122}), BHUM 1415 (GFP-Tec1^{AS 125–240}), BHUM 1418 (GFP-Tec1^{AS 301–400}) bzw. BHUM 1202 (GFP-Tec1^{AS 395–486}) transformiert waren, in Flüssigmedium kultiviert. Sie wurden bis zur exponentiellen Phase herangezogen und dann aus jeweils gleichen Zellmengen die Proteine extrahiert. Nach Auftrennung der Proteine in einem SDS-Polyacrylamidgel

wurde ein Immunoblot mit Antikörpern gegen GFP durchgeführt, durch den die einzelnen Fusionsproteine detektiert wurden (Abb. 2.5). Eine zusätzliche Immuno-detektion mit Antikörpern gegen das Protein Cdc28 diente als Abgleich für die Quantifizierung der GFP-(Tec1-) Proteinmengen, da dieses Protein in allen Zellen in gleicher Menge vorhanden sein sollte. Im Immunoblot (anti GFP) ist zu sehen, dass freies GFP in großer Menge hergestellt wurde. Im Vergleich zum Fusionsprotein mit dem gesamten Tec1 (GFP-Tec1^{AS 1-486}) (BHUM 1196) war 21-mal so viel freies GFP in den entsprechenden Zellen vorhanden (Abb. 2.5).

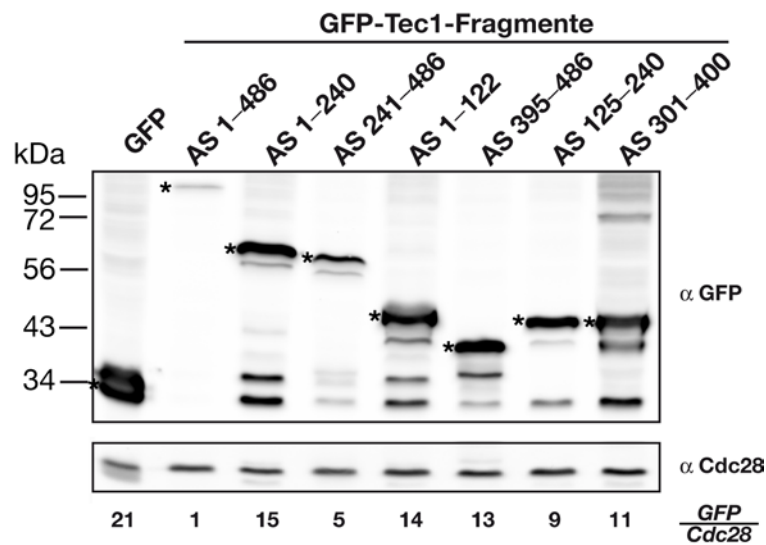


Abb. 2.5: Immunochemische Detektion von GFP und verschiedenen GFP-Tec1-Fragmenten zur Analyse der Mengenverhältnisse. Zellen des Stammes YHUM 0792 (*tec1Δ*), die jeweils eines der nachfolgend aufgelisteten Konstrukte herstellten, wurden in Flüssig-medium bis zu einer OD_{600nm} von ca. 0,7 angezogen und aus gleichen Mengen Zellen wurden die Proteine isoliert. Folgende Konstrukte wurden untersucht: BHUM 1156 (GFP), BHUM 1196 (GFP-Tec1), BHUM 1197 (GFP-Tec1^{AS 1-240}), BHUM 1198 (GFP-Tec1^{AS 241-486}), BHUM 1199 (GFP-Tec1^{AS 1-122}), BHUM 1202 (GFP-Tec1^{AS 395-486}), BHUM 1415 (GFP-Tec1^{AS 125-240}) und BHUM 1418 (GFP-Tec1^{AS 301-400}). Mit den Proben wurde ein Immunoblot durchgeführt, bei dem Antikörper gegen GFP verwendet wurden (α GFP). Mit Antikörpern gegen das Protein Cdc28, dessen Gen konstitutiv exprimiert ist, wurde überprüft ob gleiche Mengen an Proteinextrakt eingesetzt wurden (α Cdc28). Für die Quantifizierung wurde das Verhältnis von GFP-(Fusions-)Protein zu Cdc28 berechnet (GFP/Cdc28) und als Bezugsgröße für die Normalisierung der Wert von GFP-Tec1^{AS 1-486} als 1 definiert. Das Sternchen (*) markiert das jeweilige GFP-Fusionsprotein bzw. GFP.

Zwischen den Fusionsproteinen bestehend aus der N- bzw. C-terminalen Hälfte von Tec1 und GFP (GFP-Tec1^{AS 1-240}; BHUM 1197 und GFP-Tec1^{AS 241-486}; BHUM 1198) besteht ebenfalls ein deutlicher Unterschied bezüglich der Proteinmenge. Während das Fusionsprotein mit der C-terminalen Hälfte von Tec1 nur 5-mal so viel in der Zelle vorhanden war wie GFP-Tec1, hatte das mit der N-terminalen Hälfte eine 15-fache Konzentration. Von vier überlappenden kürzeren Fragmenten (GFP-Tec1^{AS 1-122}; BHUM 1199, GFP-Tec1^{AS 395-486}; BHUM 1202, GFP-Tec1^{AS 125-240}; BHUM 1415, bzw.

GFP-Tec1^{AS 301–400}; BHUM 1418) wurde ebenfalls die Protein-menge bestimmt. Diese Fusionsproteine lagen in ungefähr gleichen Mengen in den Zellen vor (9- bis 14-mal so viel wie GFP-Tec1).

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass Tec1 zwei putative NLSs enthält, die zwei funktionellen Domänen des Transkriptionsfaktors zugeordnet werden konnten, nämlich der DNA-Bindedomäne (TEA Domäne) und der Ste12-Bindedomäne.

2.1.3. Die Kernlokalisierung von Tec1 hängt nicht von Ste12, Kss1, Fus3 oder Nis1 ab

Da der Bereich der NLS2 mit dem der Ste12-Bindedomäne übereinstimmt, wurde als nächstes untersucht, ob der Kerntransport von Tec1 abhängig von dem Interaktionspartner Ste12 ist. Dazu wurden sowohl GFP-Tec1 (BHUM 1196), als auch GFP-Tec1^{AS 125–240} (BHUM 1415) und GFP-Tec1^{AS 301–400} (BHUM 1418) in einem *ste12Δ*-Stamm (YHUM 0930) hergestellt und die Lokalisierung überprüft. Anhand der Bilder und der Quantifizierungswerte der nukleozytoplasmatischen Relation konnte man feststellen, dass die Abwesenheit von Ste12 keinen negativen Einfluss auf die Kernlokalisierung von Tec1 bzw. die der NLS-enhaltenden Fragmente hatte (Abb. 2.6).

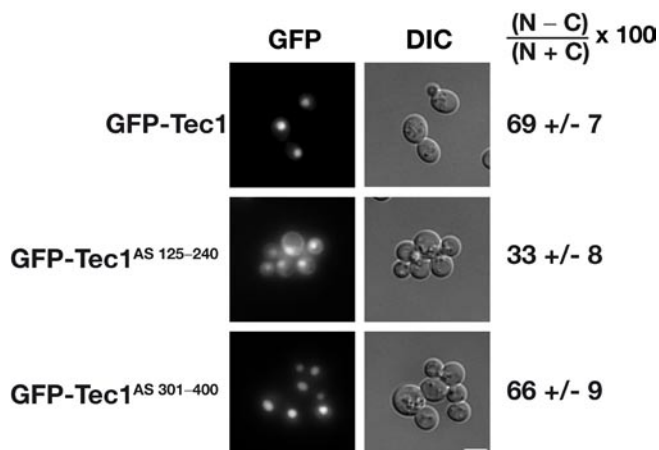


Abb. 2.6: Die Kernlokalisierung von GFP-Tec1 ist nicht von Ste12 abhängig. GFP-Tec1 (BHUM 1196), GFP-Tec1^{AS 125–240} (BHUM 1415) bzw. GFP-Tec1^{AS 301–400} (BHUM 1418) wurden in YHUM 0930 (*ste12Δ*) hergestellt und die Lokalisierung durch Fluoreszenzmikroskopie untersucht. Zu sehen ist jeweils ein Bild der Fluoreszenz von GFP nach Anregung bei 395 nm (GFP) und das zugehörige Durchlichtbild (DIC). Die Quantifizierung der nukleozytoplasmatischen Relation durch die Formel $(N - C)/(N + C) \times 100$ ist jeweils angegeben, wobei N die Fluoreszenzintensität im Zellkern und C die Intensität im Zytoplasma ist. Der Maßstab entspricht 5 µm.

Vergleicht man die Werte der nukleozytoplasmatischen Relation in YHUM 1889 (*tec1Δ*, *NUP49::tagRFP*) mit denen in YHUM 0930 (*ste12Δ*), so kann man feststellen, dass der Wert für GFP-Tec1 (BHUM 1196) in dem *ste12Δ*-Stamm deutlich höher ist (69 +/- 7) als in dem Stamm YHUM 1189 (55 +/- 15) (Abb. 2.3, Abb. 2.6). Bei den NLS-enthaltenden Fragmenten gibt es nur kleine Abweichungen der Quantifizierungswerte (33 +/- 8 bzw. 37 +/- 10 für GFP-Tec1^{AS 125-240} und 66 +/- 9 bzw. 63 +/- 12 für GFP-Tec1^{AS 301-400} in YHUM 0930 bzw. YHUM 1889) (Abb. 2.3, Abb. 2.6).

Prinzipiell könnten auch andere Interaktionspartner von Tec1 eine Rolle bei dessen Kerntransport spielen, indem sie das Protein binden und durch einen Huckepack-Mechanismus mit in den Kern nehmen. Die mit Tec1 interagierende MAP-Kinase Fus3 wurde in diesem Zusammenhang untersucht. Sie lokalisiert sowohl im Zytoplasma als auch im Kern (Choi *et al.*, 1999). Die für das filamentöse Wachstum zuständige MAP-Kinase Kss1, die im Zellkern lokalisiert, wurde ebenfalls diesbezüglich untersucht, obwohl sie nicht direkt mit Tec1 interagiert (Ma *et al.*, 1995; Brückner *et al.*, 2004). In einem *in vivo*-Interaktionstest konnte jedoch Tec1 mit Kss1 zusammen isoliert werden, was für eine indirekte Interaktion der beiden Proteine spricht (Ho *et al.*, 2002).

GFP-Tec1 (BHUM 1196), sowie GFP-Tec1^{AS 110-270} (BHUM 1200) und GFP-Tec1^{AS 253-412} (BHUM 1201) wurden in YHUM 0677 (*kss1Δ*), YHUM 0678 (*fus3 Δ*) und YHUM 0679 (*kss1 Δ*, *fus3 Δ*) hergestellt und die Lokalisierung der GFP-markierten Proteine im Fluoreszenzmikroskop untersucht (Abb. 2.7).

Bei keinem der Stämme konnte eine deutlich veränderte Lokalisierung der jeweiligen Fusionsproteine festgestellt werden. Auch in einem Stamm, in dem das Protein Nis1 deletiert ist (YHUM 0899) war keine Auswirkung auf die Lokalisierung der GFP-Tec1-Proteine sichtbar (Abb. 2.7). Nis1 wurde in einem Hefe-zwei-Hybrid Test und durch Ko-Affinitätsreinigung als Interaktionspartner von Tec1 identifiziert (Brückner, 2002). Die genaue Funktion dieses Proteins ist noch unklar, es interagiert jedoch auch mit Septinen und Proteinen des mitotischen Signalnetzwerkes. Es lokalisiert im Zellkern, sowie während der G2/M-Phase am Sprosshals (Iwase & Toh-e, 2001).

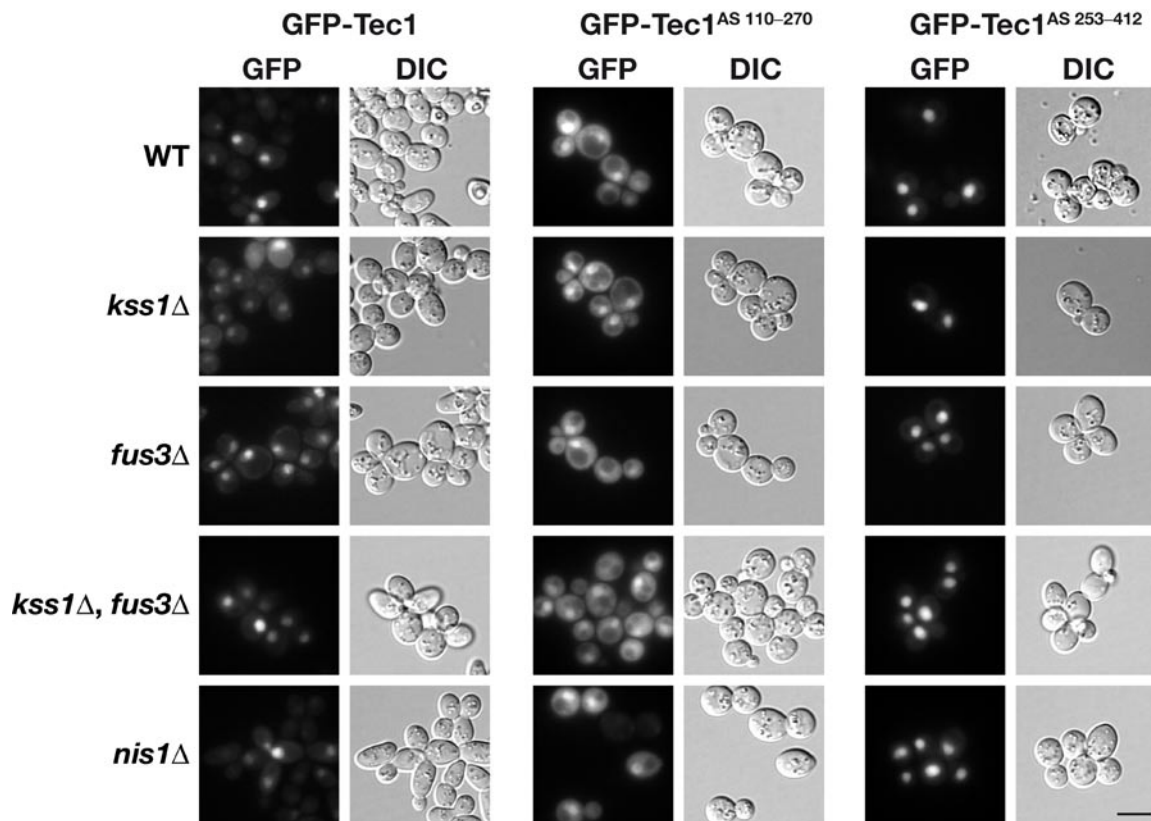


Abb. 2.7: Die Kernlokalisierung von GFP-Tec1 ist nicht von Kss1, Fus3 oder Nis1 abhängig. Die Konstrukte GFP-Tec1 (BHUM 1196) (WT), GFP-Tec1^{AS 110–270} (BHUM 1200) und GFP-Tec1^{AS 253–412} (BHUM 1201) wurden jeweils in den Stämmen YHUM 0677 (*kss1Δ*), YHUM 0678 (*fus3Δ*), YHUM 0679 (*kss1Δ, fus3Δ*) und YHUM 0899 (*nis1Δ*) hergestellt und die Lokalisierung der Fusionsproteine durch Fluoreszenzmikroskopie bestimmt. Zu sehen ist jeweils ein Bild der Fluoreszenz von GFP nach Anregung bei 395 nm (GFP) und das zugehörige Durchlichtbild (DIC). Der Maßstab entspricht 5 μ m.

2.1.4. Mehrere Aminosäuren sind sowohl für die NLS1-vermittelte Kernlokalisierung als auch für die TCS-Bindung von Tec1 entscheidend

Der Bereich der NLS1 konnte durch die experimentelle Analyse der verschiedenen GFP-Tec1-Fusionsproteine auf die Aminosäuren 125–240 eingegrenzt werden. Dieser 115 Aminosäuren lange Bereich ist im Vergleich zu bereits bekannten NLS Sequenzen sehr groß, jedoch ist es nicht unüblich, dass DNA-Bindedomänen auch gleichzeitig für den Kerntransport zuständig sind (LaCasse & Lefebvre, 1995; Cokol *et al.*, 2000). Einige dieser mit DNA-Bindedomänen überlappenden NLSs wurden durch Punktmutationen näher charakterisiert und es konnte gezeigt werden, dass Kernlokalisierung und DNA-Bindung jeweils voneinander unabhängig sind (Matheny *et al.*, 1994; Varagona & Raikhel, 1994; Boehm *et al.*, 1995; Zandi *et al.*, 1997; Li *et al.*, 2001; Shostak & Yamamoto, 2005).

Um die putative NLS1 von Tec1 näher zu charakterisieren, wurden verschiedene Aminosäuren durch sequenzspezifische Punktmutagenese zu Alanin mutiert (Abb. 2.8). Es wurde sowohl die Auswirkung der Aminosäureaustausche auf die Funktionalität der NLS1, als auch auf die Fähigkeit zur Bindung an TCS-Elemente in der DNA und der Aktivierung eines Reportergens über TCS-Elemente im Promotor untersucht. Ziel war es, die für die Kernlokalisierung mittels NLS1 kritischen Aminosäuren zu identifizieren und einen möglichen Zusammenhang zwischen DNA-Bindung und Kernlokalisierung zu untersuchen.

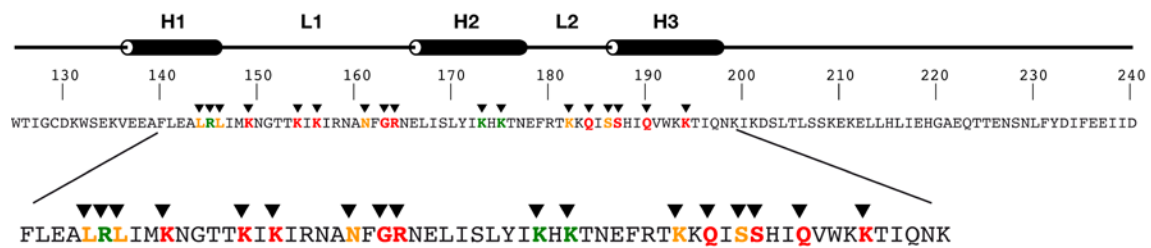


Abb. 2.8: Schematische Darstellung der Sequenz und Sekundärstruktur der NLS1 von Tec1. Die TEA-Domäne besteht aus drei Helices (H1, H2 und H3), zwischen denen Loop-Bereiche (L1 und L2) sind (Anbanandam *et al.*, 2006). Die Sequenz der NLS1 von Tec1 (AS 125–240) ist dargestellt und die in dieser Arbeit zu Alanin mutierten Aminosäuren sind mit einer Pfeilspitze markiert. Der Effekt der Austausche auf die NLS1-vermittelte Kernlokalisierung ist farblich gekennzeichnet: grün = kein Effekt, orange = leichter Effekt, rot = starker Effekt. Der Bereich, in dem die mutierten Aminosäuren liegen, ist zusätzlich vergrößert dargestellt.

Die zu untersuchenden Aminosäuren in der DNA-Bindedomäne von Tec1 wurden nach vier verschiedenen Kriterien ausgewählt. Erstens Aminosäuren, die zwischen der TEA-Domäne von Tec1 und der anderer Organismen hoch konserviert sind: L144, L146, K154, G163, R164, K173, K175, S186 und S187. Zweitens basische Aminosäuren, da solche in NLS Sequenzen häufig eine Rolle spielen: R145, K149, K156, K182 und K194. Drittens Aminosäuren, die an der DNA-Bindung beteiligt sein könnten, da deren homologe Reste in der TEA-Domäne des menschlichen TEF-1 Proteins eine chemische Verschiebung in einem ^1H , ^{15}N -heteronuclear single quantum coherence-Spektrum bei Bindung an DNA zeigten, was auf eine Rolle dieser Reste bei der TCS-Bindung hinweist (Anbanandam *et al.*, 2006): N161, G163, S186 und S187. Und viertens Aminosäuren, die sich in einem Strukturmodell der DNA-gebundenen TEA-Domäne von Tec1, das mit Hilfe der Daten der humanen TEA-Domäne von TEF-1 (Anbanandam *et al.*, 2006) modelliert wurde, in räumlicher Nähe zur DNA befinden: K182, Q184, S186, Q190 und Q194. Einige der ausgewählten Aminosäuren erfüllen

mehrere Kriterien gleichzeitig. Alle genannten Aminosäuren wurden jeweils gegen Alanin ausgetauscht.

Da dies eine kleine, unpolare Aminosäure ist, sind durch den Austausch keine elektrostatischen Effekte oder Auswirkungen auf die Sekundärstruktur zu erwarten (Cunningham & Wells, 1989). Die Punktmutagenese wurde in verschiedenen Konstrukten durchgeführt: in *TEC1(P)::GFP::TEC1^{AS 1-240}::TEC1(t)* (BHUM 1197) für die mikroskopische Analyse der Lokalisierung, in *MBP::TEC1::FLAG* (pMALc2) (BHUM 0388) für die heterologe Expression der Proteine in *E. coli* und eine anschließende *in vitro* DNA-Bindestudie (EMSA), sowie in *TEC1(P)::TEC1* (BHUM 0697) für die Untersuchung der Genaktivierung über TCS-Elemente *in vivo* (β -Galaktosidasetest). Ein Teil der Mutationen in dem Konstrukt *MBP::TEC1::FLAG* (pMALc2) (BHUM 0388) wurde von Juliane Wunderlich in einer von mir betreuten Bachelorarbeit hergestellt und die DNA-Bindung untersucht (Wunderlich, 2008).

Um den Effekt der Punktmutationen auf die Funktion der NLS1 untersuchen zu können, wurden diese in das Fusionsprotein bestehend aus GFP und der N-terminalen Hälfte von Tec1 (GFP-Tec1^{AS 1-240}) (BHUM 1197) eingebracht, da hier die NLS2 nicht vorhanden ist und man somit den NLS1-vermittelten Kernimport isoliert beobachten kann. Das Protein GFP-Tec1^{AS 1-240} zeigte eine deutliche Akkumulation im Zellkern, eine gewisse Menge war aber auch im Zytoplasma lokalisiert, weshalb der Wert der nukleozytoplasmatischen Relation bei 27 +/- 8 liegt. Zwei Punktmutanten zeigten eine mit dem Wildtypprotein vergleichbare Akkumulation im Kern: GFP-Tec1^{AS 1-240, R145A} (BHUM 1387) und GFP-Tec1^{AS 1-240, K173A, K175A} (BHUM 1476) (Abb. 2.9). Einige der Punktmutationen hatten einen leichten Effekt auf die Kernlokalisierung: GFP-Tec1^{AS 1-240, L144A} (BHUM 1690), GFP-Tec1^{AS 1-240, L146A} (BHUM 1477), GFP-Tec1^{AS 1-240, N161A} (BHUM 1783), GFP-Tec1^{AS 1-240, K182A} (BHUM 1779) und GFP-Tec1^{AS 1-240, 186A} (BHUM 1781) (Abb. 2.9). Die Quantifizierungswerte lagen zwischen 17 +/- 7 (GFP-Tec1^{AS 1-240, L146A}; BHUM 1477) und 21 +/- 7 (GFP-Tec1^{AS 1-240, S186A}; BHUM 1781). Die anderen punktmultierten Proteine zeigten einen vollständigen Verlust der NLS-Funktion, da keine Akkumulation im Kern mehr erkennbar war: GFP-Tec1^{AS 1-240, K149A} (BHUM 1474), GFP-Tec1^{AS 1-240, K154A, I155A} (BHUM 1478), GFP-Tec1^{AS 1-240, K154A, K156A} (BHUM 1475), GFP-Tec1^{AS 1-240, K154A} (BHUM 1422), GFP-Tec1^{AS 1-240, K156A} (BHUM 1386), GFP-Tec1^{AS 1-240, G163A} (BHUM 1812), GFP-Tec1^{AS 1-240, R164A} (BHUM 1665), GFP-Tec1^{AS 1-240, Q184A} (BHUM 1780), GFP-Tec1^{AS 1-240, S187A} (BHUM 1666), GFP-Tec1^{AS 1-240, Q190A} (BHUM 1782) und GFP-Tec1^{AS 1-240, K194A} (BHUM 1813) (Abb.

2.9). Die Werte liegen hier zwischen 5 +/- 6 (GFP-Tec1^{AS 1-240, G163A}; BHUM 1812) und 14 +/- 8 (GFP-Tec1^{AS 1-240, K156A}; BHUM 1386).

GFP-Tec1 ^{AS 1-240}				GFP-Tec1 ^{AS 1-240}			
	GFP	DIC	$\frac{(N - C)}{(N + C)} \times 100$		GFP	DIC	$\frac{(N - C)}{(N + C)} \times 100$
WT			27 +/- 8				
L144A			18 +/- 6	G163A			5 +/- 6
R145A			27 +/- 8	R164A			10 +/- 8
L146A			17 +/- 7	K173A, K175A			25 +/- 9
K149A			11 +/- 6	K182A			21 +/- 6
K154A, I155A			n. d.	Q184A			7 +/- 5
K154A, K156A			n. d.	S186A			21 +/- 7
K154A			7 +/- 7	S187A			7 +/- 5
K156A			14 +/- 8	Q190A			8 +/- 6
N161A			20 +/- 6	Q194A			11 +/- 7

Abb. 2.9: Mehrere Aminosäuren sind kritisch für die Funktion der NLS1 von Tec1. Folgende Varianten von GFP-Tec1^{AS 1-240} wurden in dem Stamm YHUM 1889 (*tec1Δ*, *NUP49::tagRFP*) hergestellt: GFP-Tec1^{AS 1-240} (BHUM 1197) (WT), GFP-Tec1^{AS 1-240, L144A} (BHUM 1690), GFP-Tec1^{AS 1-240, R145A} (BHUM 1387), GFP-Tec1^{AS 1-240, L146A} (BHUM 1477), GFP-Tec1^{AS 1-240, K149A} (BHUM 1474), GFP-Tec1^{AS 1-240, K154A, I155A} (BHUM 1478), GFP-Tec1^{AS 1-240, K154A, K156A} (BHUM 1475), GFP-Tec1^{AS 1-240, K154A} (BHUM 1422), GFP-Tec1^{AS 1-240, K156A} (BHUM 1386), GFP-Tec1^{AS 1-240, N161A} (BHUM 1783), GFP-Tec1^{AS 1-240, G163A} (BHUM 1812), GFP-Tec1^{AS 1-240, R164A} (BHUM 1665), GFP-Tec1^{AS 1-240, K173A, K175A} (BHUM 1476), GFP-Tec1^{AS 1-240, K182A} (BHUM 1779), GFP-Tec1^{AS 1-240, Q184A} (BHUM 1780), GFP-Tec1^{AS 1-240, S186A} (BHUM 1781), GFP-Tec1^{AS 1-240, S187A} (BHUM 1666), GFP-Tec1^{AS 1-240, Q190A} (BHUM 1782) und GFP-Tec1^{AS 1-240, K194A} (BHUM 1813). Zu sehen ist jeweils ein Bild der Fluoreszenz von GFP nach Anregung bei 395 nm (GFP) und das zugehörige Durchlichtbild (DIC). Die Quantifizierung der nukleozytoplasmatischen Relation durch die Formel $(N - C)/(N + C) \times 100$ ist

jeweils angegeben, wobei N die Fluoreszenzintensität im Zellkern und C die Intensität im Zytoplasma ist. Der Effekt der Punktmutation ist jeweils farblich gekennzeichnet: grün = kein Effekt, orange = leichter Effekt, rot = starker Effekt. Der Maßstab entspricht 5 µm.

Es konnten also die Aminosäuren R145, K173 und K175 gegen Alanin ausgetauscht werden, ohne dass dies einen Effekt auf die Lokalisierung von GFP-Tec1^{AS 1-240} hatte. Einen leichten Effekt hatte der Austausch der Aminosäuren L144, L146, N161, K182 und S186. Die Mutation der meisten Aminosäuren, nämlich K149, K154, K156, G163, R164, Q184, S187, Q190 und Q194, hatte eine starke Auswirkung, also den Verlust der NLS-Funktion zur Folge.

Als nächstes wurden die gleichen Aminosäuren auf ihre Funktion bei der Bindung von TCS-Elementen in einem *in vitro*-Experiment (elektrophoretischer Mobilitätsshift-Assay, EMSA) untersucht. Dazu wurden die Punktmutationen in das Konstrukt *MBP::TEC1::FLAG* im Vektor pMALc2 eingeführt und das mutierte Protein anschließend in *E. coli*-Zellen hergestellt. Die Proteinexpression der MBP-Tec1-Punktmutanten war gleich stark (Daten nicht gezeigt). Jeweils 3 µg der *E. coli*-Proteinrohextrakte wurden im Reaktionsansatz eingesetzt und mit 40 fmol Cy-5 markierter TCS-DNA inkubiert. In einem nativen Polyacrylamidgel wurde von den Tec1-Proteinen gebundene und ungebundene DNA der Größe nach aufgetrennt und die Fluoreszenz der markierten DNA mit dem „TyphoonTM Variable Mode Imager 9400“ (GE HEALTHCARE, München) detektiert. Die vom Protein gebundene DNA hat im elektrischen Feld eine deutlich langsamere Laufgeschwindigkeit als die freie DNA und ist daher im oberen Teil des Gels zu sehen. Das Wildtyp MBP-Tec1 Protein zeigte wie erwartet eine starke Bindung an die TCS-Elemente, während in einem Ansatz ohne Protein (nur TCS) und einem mit freiem MBP keine Änderung im Laufverhalten der (freien) DNA zu beobachten war (Abb. 2.10). Die Punktmutanten MBP-Tec1^{L144A} (BHUM 1388), MBP-Tec1^{R145A} (BHUM 1670), MBP-Tec1^{L146A} (BHUM 1389) und MBP-Tec1^{N161A} (BHUM 1393) verhielten sich wie das Wildtypprotein, sie konnten die TCS-DNA sehr gut binden (Abb. 2.10). Die relative Bindeaktivität, die für das Wildtypprotein auf 100 % gesetzt wurde, lag bei diesen Mutanten zwischen 85 % und 109 %.

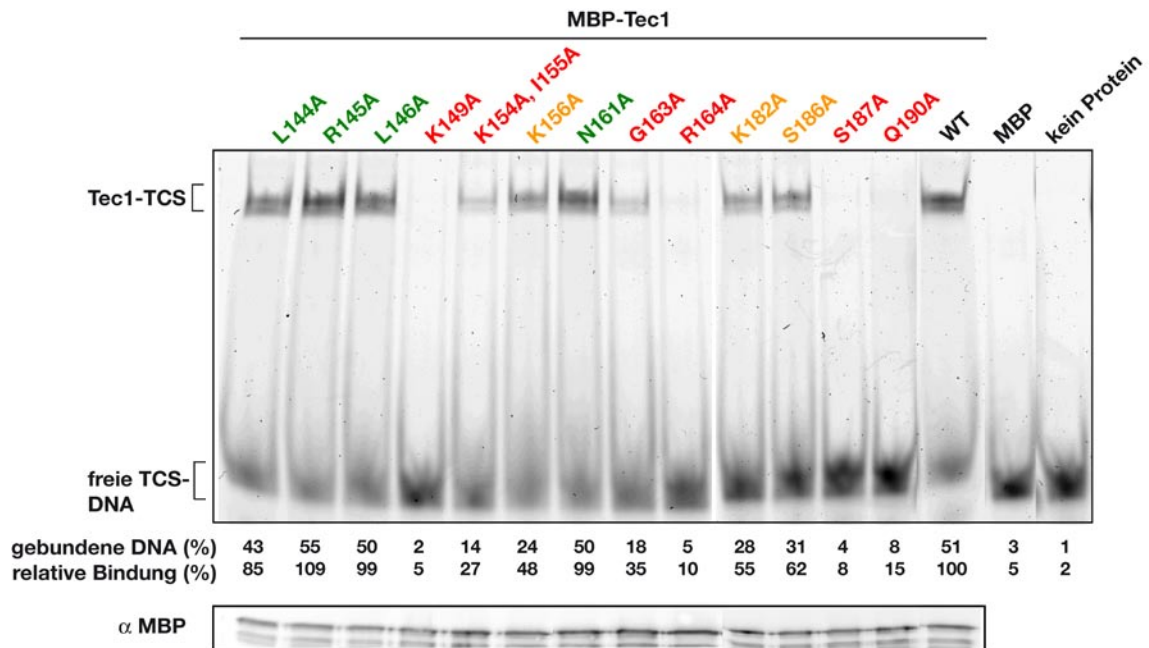


Abb. 2.10: Mehrere Aminosäuren sind für die Bindung der TEA-Domäne an TCS-Elemente kritisch. Gelretardierungsanalyse (elektrophoretischer Mobilitätsshift-Assay, EMSA). Die folgenden MBP-Tec1-Varianten wurden in *E. coli* hergestellt und mit 40 fmol Cyber5-markierter, doppelsträngiger TCS-DNA in einen Gelretardierungsexperiment auf ihr Bindeverhalten untersucht: MBP-Tec1^{L144A} (BHUM 1388), MBP-Tec1^{R145A} (BHUM 1670), MBP-Tec1^{L146A} (BHUM 1389), MBP-Tec1^{K149A} (BHUM 1671), MBP-Tec1^{K154A, I155A} (BHUM 1390), MBP-Tec1^{K156A} (BHUM 1845), MBP-Tec1^{N161A} (BHUM 1393), MBP-Tec1^{G163A} (BHUM 1394), MBP-Tec1^{R164A} (BHUM 1384), MBP-Tec1^{K182A} (BHUM 1847), MBP-Tec1^{S186A} (BHUM 1849), MBP-Tec1^{S187A} (BHUM 1401), MBP-Tec1^{Q190A} (BHUM 1851), MBP (BHUM 390) und MBP-Tec1 (BHUM 388) (WT). Ungebundene DNA kann sich schnell im Gel bewegen und ist daher im unteren Bereich zu sehen (freie TCS-DNA), während DNA, die das im Ansatz enthaltene Protein gebunden hat, aufgrund des Größenunterschieds stark verlangsamt wird und daher im oberen Teil des Gels zu finden ist (Tec1-TCS). Mit den Proteinextrakten wurde zusätzlich ein Immunoblot mit einem Antikörper gegen MBP durchgeführt, um zu überprüfen, ob in den jeweiligen Extrakten vergleichbare Mengen an MBP-Tec1-Protein vorlagen (α MBP). Die Quantifizierung der Gelretardierungsanalyse erfolgte mit dem Programm ImageJ (<http://rsbweb.nih.gov/ij/>) (Rasband, 1997). Die gebundene DNA (%) entspricht dem Quotient aus der Menge an gebundener DNA geteilt durch die Menge an insgesamt detektierter DNA. Für die relative Bindung (%) wurde der Wert von wildtypischem MBP-Tec1 auf 100 % gesetzt. Der Effekt der Punktmutation auf die DNA-Bindung ist farblich gekennzeichnet: grün = kein Effekt, orange = leichter Effekt, rot = starker Effekt.

Eine zweite Gruppe von Punktmutanten zeigte eine schwächere DNA-Bindung: MBP-Tec1^{K156A} (BHUM 1845), MBP-Tec1^{K182A} (BHUM 1847) und MBP-Tec1^{S186A} (BHUM 1849). Hier waren die relativen Bindeaktivitäten 48 %, 55 % bzw. 62 %. Die anderen Mutationen hatten einen starken Effekt auf die TCS-Bindung. Zwei dieser Punktmutanten, MBP-Tec1^{K154A, I155A} (BHUM 1390) und MBP-Tec1^{G163A} (BHUM 1394), konnten nur noch sehr schwach an die DNA binden (27 % bzw. 35 %), während bei vier Punktmutanten die DNA-Bindung nicht mehr möglich war: MBP-Tec1^{K149A} (BHUM 1671), MBP-Tec1^{R164A} (BHUM 1384), MBP-Tec1^{S187A} (BHUM 1401) und

MBP-Tec1^{Q190A} (BHUM 1851). Dass in allen Reaktionsansätzen vergleichbare Mengen an MBP-Tec1 Protein vorhanden waren, wurde durch einen Immunoblot gezeigt (Abb. 2.10, α MBP).

Um die Auswirkung der Punktmutationen auf die Funktionalität des gesamten Transkriptionsfaktors *in vivo* zu untersuchen, wurden die entsprechenden Aminosäuren in dem Konstrukt *TEC1(P)::TEC1* (BHUM 0697) mutiert und die Proteine in einem Hefestamm hergestellt, der ein *TCS-CYC1(P)-LacZ* Reporterkonstrukt enthält (YHUM 1363). Dieses besteht aus dem Gen für das Enzym β -Galaktosidase (LacZ), das in Abwesenheit von Tec1 durch einen Teil des Promotors von *CYC1* (*CYC1(P)*) basal exprimiert wird. Funktionelles Tec1 kann jedoch über die TCS-Elemente in diesem Konstrukt die Expression deutlich aktivieren (Köhler *et al.*, 2002). Durch einen Enzymtest der β -Galaktosidase kann man schließlich Rückschlüsse auf die Aktivität von Tec1 ziehen.

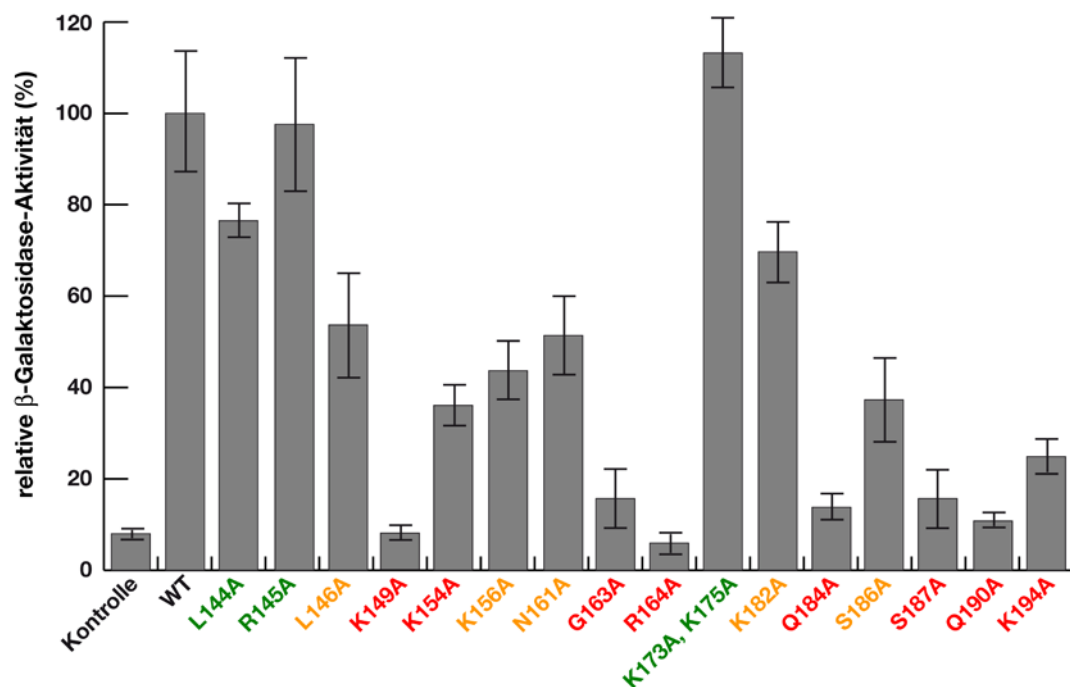


Abb. 2.11: *In vivo*-Analyse der TCS-Aktivierung verschiedener Tec1-Varianten. Messung der relativen β -Galaktosidaseaktivität in dem Stamm YHUM 1363 (*tec1Δ::HIS3*, *TCS-CYC1(P)-lacZ::URA3*), der die folgenden Konstrukte herstellte: B2439 (Leerplasmid YCplac111) (Kontrolle), BHUM 0697 (Tec1) (WT), BHUM 1761 (Tec1^{L144A}), BHUM 1672 (Tec1^{R145A}), BHUM 1480 (Tec1^{L146A}), BHUM1674 (Tec1^{K149A}), BHUM 1689 (Tec1^{K154A}), BHUM 1777 (Tec1^{K156A}), BHUM 1763 (Tec1^{N161A}), BHUM 1482 (Tec1^{G163A}), BHUM 1484 (Tec1^{R164A}), BHUM 1688 (Tec1^{K173A, K175A}), BHUM 1765 (Tec1^{K182A}), BHUM 1767 (Tec1^{Q184A}), BHUM 1769 (Tec1^{S186A}), BHUM 1483 (Tec1^{S187A}), BHUM 1771 (Tec1^{Q190A}) und BHUM 1775 (Tec1^{K194A}). Der Wert der β -Galaktosidaseaktivität von Wildtyp-Tec1 wurde als 100 % definiert. Der Effekt der Punktmutationen auf die TCS-Aktivierung ist farblich gekennzeichnet: grün = kein Effekt, orange = leichter Effekt, rot = starker Effekt.

Der Wert der relativen β -Galaktosidase-Aktivität für Wildtyp-Tec1 (BHUM 0697) wurde auf 100 % gesetzt, die Kontrolle ohne Tec1-Protein (B2439) spiegelt den Wert der basalen Expression wider und liegt bei 8 % (Abb. 2.11). Die Punktmutanten Tec1^{R145A} (BHUM 1672) und Tec1^{K173A, K175A} (BHUM 1688) sind voll funktionsfähig (98 % bzw. 113 % relative Aktivität) (Abb. 2.11). Auch Tec1^{L144A} (BHUM 1761) ist mit 77 % noch mit der Aktivität des Wildtyps vergleichbar. Einige der Punktmutanten waren eingeschränkt funktionsfähig: Tec1^{L146A} (BHUM 1480), Tec1^{K156A} (BHUM 1777), Tec1^{N161A} (BHUM 1763), Tec1^{K182A} (BHUM 1765) und Tec1^{S186A} (BHUM 1769) (Abb. 2.11). Die Werte liegen zwischen 37 % und 70 % der Aktivität des Wildtyps (schwacher Effekt). Eine Reduzierung der TCS-Aktivierung auf unter 37 % verglichen mit dem Wildtyp hatten die Punktmutationen Tec1^{K149A} (BHUM1674), Tec1^{K154A} (BHUM 1689), Tec1^{G163A} (BHUM 1482), Tec1^{R164A} (BHUM 1484), Tec1^{Q184A} (BHUM 1767), Tec1^{S187A} (BHUM 1483), Tec1^{Q190A} (BHUM 1771) und Tec1^{K194A} (BHUM 1775) zur Folge (starker Effekt) (Abb. 2.11).

Die auf das jeweilige Wildtypprotein bezogenen relativen Messergebnisse dieses Kapitels von Lokalisierung (nukleozytoplasmatische Relation), TCS-Bindung und TCS-Aktivierung der analysierten Punktmutanten sind insgesamt in Tabelle 3 zusammengefasst. Alle Werte sind relativ zum jeweiligen Wildtypprotein berechnet. Da freies GFP leicht im Kern akkumuliert ist, liegt die nukleozytoplasmatische Relation hierfür bei 8 +/- 6, was 30 % des Wertes von GFP-Tec1^{AS 1-240} entspricht. Daher wurde für die Berechnung der relativen Werte der nukleozytoplasmatischen Relation vorher jeweils der Wert 8 von den absoluten Werten abgezogen.

Man sieht deutlich, dass eine hohe Korrelation zwischen den Ergebnissen der drei Messreihen besteht. Viele Aminosäuren, die bei der Funktion der NLS1 eine Rolle spielen, sind auch für die TCS-Bindung und -Aktivierung wichtig (K149, K154, G163, R164, S187, und Q190) (Tabelle 3). Die Aminosäure R145 konnte gegen Alanin ausgetauscht werden, ohne dass dies einen Effekt auf eine der drei untersuchten Funktionen hatte. Auch der Austausch von K173 und K175 hatte keinen Effekt auf die Kernlokalisierung und die TCS-Aktivierung und daher wahrscheinlich auch keine Auswirkung auf die DNA-Bindung (Tabelle 3). Die Mutation von L144, L146 und N161 hatte keinen Effekt auf die DNA-Bindung, jedoch war hier ein leichter Effekt auf die Kernlokalisierung und bei L146 auch auf die TCS-Aktivierung zu beobachten (Tabelle 3).

Tabelle 3: Übersicht über die relativen Quantifizierungswerte (in %) aus Abb. 2.9, 2.10 und 2.11.

	N/C-Relation	TCS-Bindung	TCS-Aktivierung	
Kontrolle	0	2	8	
WT	100	100	100	
L144A	53	85	77	
R145A	100	109	98	
L146A	47	99	54	
K149A	16	5	11	
K154A	0	27 *	36	*K154A, I155A
K156A	32	48	44	
N161A	63	99	51	
G163A	-16	35	16	
R164A	11	10	14	
K173A, K175A	89	n. d.	113	
K182A	68	55	70	
Q184A	0	n. d.	14	
S186A	68	62	37	
S187A	0	8	16	
Q190A	0	8	11	
K194A	16	n. d.	25	

Pearson Korrelationskoeffizient

Kontrollen: GFP (BHUM 1156) (N/C-Relation), kein Protein (TCS-Bindung), bzw. Leerplasmid (B2439) (TCS-Aktivierung); nicht mutierte Proteine (WT): GFP-Tec1^{AS 1-240} (BHUM 1197) (N/C-Relation), MBP-Tec1 (TCS-Bindung), bzw. Tec1 (BHUM 0697) (TCS-Aktivierung). Die Werte der jeweiligen Wildtyp-Konstrukte wurden auf 100 % gesetzt. Die N/C-Relation wurde nach der Formel $(N-C)/(N+C) \times 100$ berechnet, wobei N die Fluoreszenzintensität im Zellkern und C die Intensität im Zytoplasma ist. Der Pearson-Korrelationskoeffizient für die verschiedenen Messreihen ist jeweils angegeben. Ein Wert von 1 bedeutet, dass eine positive Korrelation besteht. Der Effekt auf Kernlokalisierung, TCS-Bindung bzw. TCS-Aktivierung ist farblich gekennzeichnet: grün = kein Effekt, orange = leichter Effekt, rot = starker Effekt. Bei der TCS-Bindung wurde nicht die Einzelmutante K154A, sondern die Doppelmutante K154A, I155A gemessen.

Mathematisch kann man die Korrelation zwischen zwei Messreihen durch den Pearson Korrelationskoeffizienten bestimmen. Dieser kann Werte zwischen -1 und +1 annehmen, wobei bei einem Wert von 0 kein linearer Zusammenhang besteht und bei +1 bzw. -1 eine positive bzw. negative lineare Korrelation besteht. Für die Werte der nukleozytoplasmatischen Relation (N/C-Relation) und der TCS-Bindung ergibt sich ein Korrelationskoeffizient von 0,86, für die Werte der TCS-Bindung und der *in vivo* TCS-Aktivierung 0,88 und schließlich für die Messreihen N/C-Relation und *in vivo* TCS-

Aktivierung ein Koeffizient von 0,90 (Tabelle 3). Dies bedeutet, dass zwischen den drei Messreihen jeweils eine starke positive lineare Korrelation besteht.

Insgesamt konnte in dieser Studie gezeigt werden, dass die Aminosäuren K149, K154, G163, R164, Q184, S187, Q190 und Q194 für die Funktion der NLS1 kritisch sind. Diese Reste waren auch gleichzeitig für die Bindung der TEA-Domäne an TCS-Elemente und die Aktivierung von Promotoren über TCS-Elemente entscheidend.

2.1.5. Die Aminosäuren K318 und R319 sind für die Funktion der NLS2 entscheidend

Die NLS2 ist durch die Analyse der GFP-Tec1-Fragmente auf den Bereich der Aminosäuren 301–400 eingegrenzt worden (Abb. 2.3). In diesem Bereich befinden sich mehrere Arginin- und Lysinreste, die aufgrund ihres basischen Charakters eine Rolle bei der Funktion der NLS spielen könnten. Diese Aminosäuren wurden alle gegen Alanin ausgetauscht, wobei benachbarte Reste gleichzeitig mutiert wurden (Abb. 2.12).



Abb. 2.12: Schematische Darstellung von Sequenz und Sekundärstruktur der NLS2 (AS 301–400) von Tec1. Mit dem Programm „Predict protein“ (www.predictprotein.org) (Rost *et al.*, 2004) wurde eine mögliche Sekundärstruktur dieser Proteinsequenz berechnet. Diese ist oberhalb der Sequenz schematisch dargestellt. H = Helix, L = Loop. Die in dieser Arbeit zu Alanin mutierten Aminosäuren sind mit einer Pfeilspitze markiert und der Effekt auf die Kernlokalisierung ist farblich gekennzeichnet: grün = kein Effekt, rot = starker Effekt.

Ein Teil der Punktmutanten wurde in der von mir betreuten Masterarbeit von Kathrin Wittkowski hergestellt und gemessen (Wittkowski, 2009). Aus diesem Grund sind ein paar der hier gezeigten Mutanten in dem Konstrukt GFP-Tec1^{AS 256–400} (BHUM 1595) eingeführt worden, da in der Masterarbeit eine andere Methode für die Mutagenese angewendet wurde als bei den von mir hergestellten Punktmutanten, die in GFP-Tec1^{AS 301–400} eingeführt wurden. Die Lokalisierung der beiden GFP-Tec1-Fragmente unterscheidet sich jedoch nicht voneinander (Abb. 2.13).

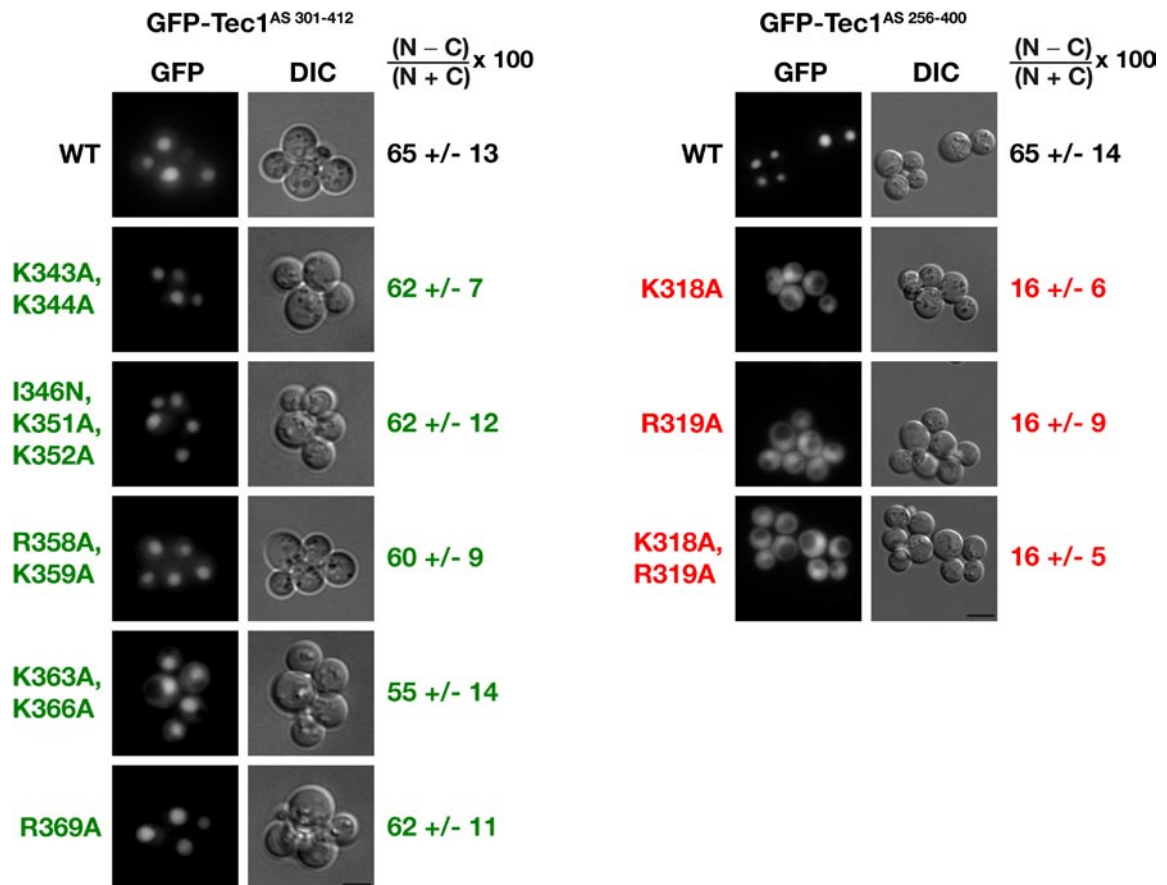


Abb. 2.13: Die Aminosäuren K318 und R319 sind kritisch für die Funktion der NLS2. Die nachfolgend aufgelisteten Konstrukte wurden im Fluoreszenzmikroskop untersucht. Zu sehen ist jeweils ein Bild der Fluoreszenz von GFP nach Anregung bei 395 nm (GFP) und das zugehörige Durchlichtbild (DIC). Der Maßstab entspricht 5 µm. Die Quantifizierung der nukleozytoplasmatischen Relation durch die Formel $\frac{(N - C)}{(N + C)} \times 100$ ist jeweils angegeben, wobei N die Fluoreszenzintensität im Zellkern und C die Intensität im Zytoplasma ist. Links: GFP-Tec1^{AS 301-412} (BHUM 1222), GFP-Tec1^{AS 301-412, K343A, K344A} (BHUM 1317), GFP-Tec1^{AS 301-412, I346N, K351A, K352A} (BHUM 1318), GFP-Tec1^{AS 301-412, K358A, K359A} (BHUM 1319), GFP-Tec1^{AS 301-412, K363A, K366A} (BHUM1320) und GFP-Tec1^{AS 301-412, R369A} (BHUM 1321) in YHUM 0792 (*tec1Δ*). Rechts: GFP-Tec1^{AS 256-400} (BHUM 1595), GFP-Tec1^{AS 256-400, K318A} (BHUM 1645), GFP-Tec1^{AS 256-400, R319A} (BHUM 1646) und GFP-Tec1^{AS 256-400, K318A, R319A} (BHUM 1598) in YHUM 0792 (*tec1Δ*). Farbliche Kennzeichnung des Effekts der Punktmutation auf die Kernlokalisierung: Grün = kein Effekt, rot = starker Effekt.

Insgesamt wurden in beiden Studien 20 Aminosäuren mutiert und die Lokalisierung der Proteine im Fluoreszenzmikroskop überprüft. Zwei der Aminosäuren, K318 und R319, sind kritisch für die Funktion der NLS2 (BHUM 1645 und BHUM 1646) (Abb. 2.13). Die anderen 18 Aminosäuren konnten gegen Alanin ausgetauscht werden, ohne dass dies eine Auswirkung auf die Kernlokalisierung hatte. Sie sind daher nicht für die Kernlokalisierung durch NLS2 entscheidend. Im Vergleich zu freiem GFP, das eine nukleozytoplasmatische Relation von 8 +/- 6 hat, war der Wert für GFP-Tec1^{AS 256-400}, K318A (BHUM 1645) mit 16 +/- 9 und für GFP-Tec1^{AS 256-400, R319A} (BHUM 1646) mit 16

+/- 6 noch leicht erhöht und das Protein daher noch etwas stärker im Kern angereichert als freies GFP. Jedoch liegt der Wert des Wildtyp-Fragmentes GFP-Tec1^{AS 256–400} bei 65 +/- 14 und ist damit viermal höher als der Wert der Punktmutanten K318A und R319A. Die Doppelmutante GFP-Tec1^{AS 256–400, K318A, R319A} (BHUM 1598) zeigte keinen kumulativen Effekt, denn der Wert liegt wie der der Einzelmutationen bei 16 +/- 5 (Abb. 2.13).

2.1.6. In Tec1 wirken NLS1 und NLS2 kumulativ auf die Kernlokalisierung des Proteins

Nachdem die NLS1 und NLS2 von Tec1 eingehend einzeln charakterisiert wurden und für beide Lokalisierungssignale kritische Aminosäuren identifiziert werden konnten, wurde als nächstes die Funktion der NLSs im gesamten Tec1-Protein untersucht. Dazu wurden die Aminosäuren K149, R164, K318 und K319, die für die Funktion von NLS1 bzw. NLS2 entscheidend sind, in dem Konstrukt GFP-Tec1 (BHUM 1196) zunächst einzeln gegen Alanin ausgetauscht und die Lokalisierung der mutierten Proteine im Fluoreszenzmikroskop untersucht (Abb. 2.14).

Alle vier Punktmutanten GFP-Tec1^{K149A} (BHUM 1403), GFP-Tec1^{R164A} (BHUM1399), GFP-Tec1^{K318A} (BHUM 1651) und GFP-Tec1^{R319A} (BHUM 1652) zeigten eine reduzierte Kernlokalisierung im Vergleich zum Wildtyp (um 20–35 %). Dies deutet darauf hin, dass beide NLSs in Tec1 funktionell sind und eine Rolle bei dessen Kerntransport spielen. Außerdem lässt sich daraus schließen, dass die beiden NLSs kumulativ wirken, denn die Störung nur einer der beiden Lokalisierungssignale hat bereits einen Effekt auf die Kernlokalisierung von Tec1, den die jeweils andere NLS nicht vollständig kompensieren kann. Wurden beide NLSs gleichzeitig durch jeweils eine Punktmutation in ihrer Funktion gestört, wie dies bei den Konstrukten GFP-Tec1^{K149A, K318A} (BHUM 1682), GFP-Tec1^{K149A, R319A} (BHUM 1653) und GFP-Tec1^{R164A, R319A} (BHUM 1680) der Fall ist, war die Kernlokalisierung von Tec1 deutlich verringert, nämlich auf Werte der nukleozytoplasmatischen Relation zwischen 18 +/- 8 und 26 +/- 8 (Abb. 2.14).

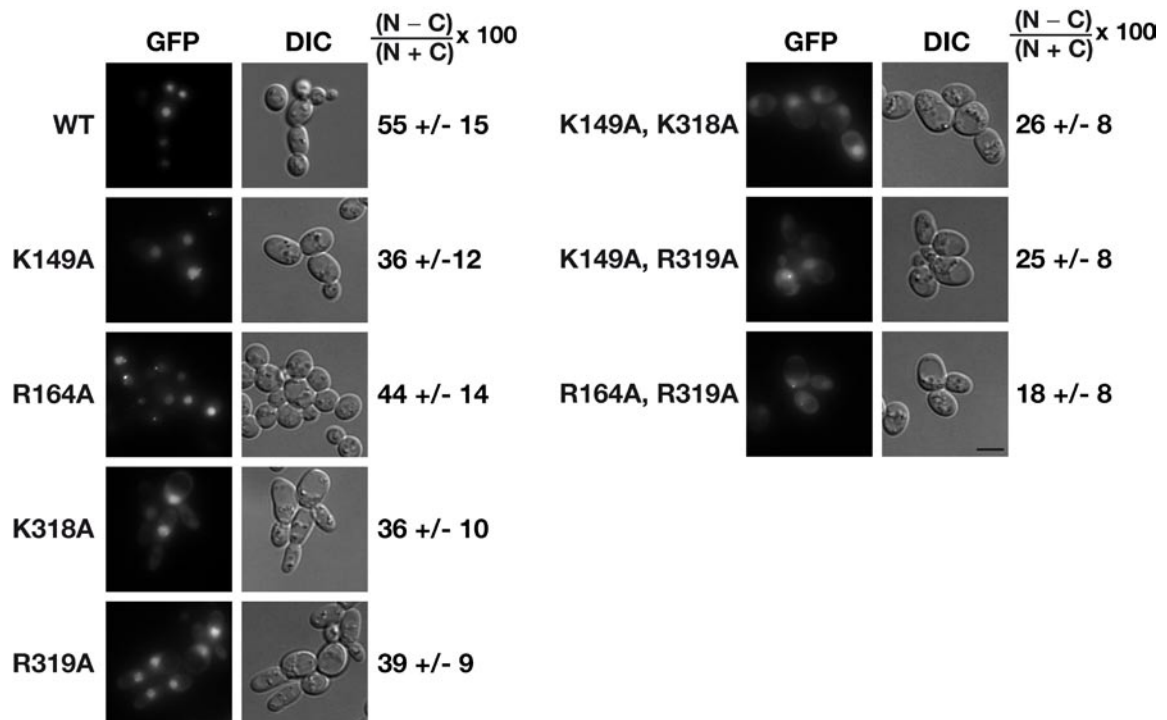


Abb. 2.14: Der Effekt verschiedener Punktmutationen auf die Lokalisierung von GFP-Tec1. Fluoreszenzmikroskopie von GFP-Tec1 (BHUM 1196), GFP-Tec1^{K149A} (BHUM 1403), GFP-Tec1^{R164A} (BHUM1399), GFP-Tec1^{K318A} (BHUM 1651), GFP-Tec1^{R319A} (BHUM 1652), GFP-Tec1^{K149A, K318A} (BHUM1682), GFP-Tec1^{K149A, R319A} (BHUM 1653) und GFP-Tec1^{R164A, R319A} (BHUM 1680) im Hefestamm YHUM 1889 (*tec1Δ, NUP49::tagRFP*). Zu sehen ist jeweils ein Bild der Fluoreszenz von GFP nach Anregung bei 395 nm (GFP) und das zugehörige Durchlichtbild (DIC). Der Maßstab entspricht 5 µm. Das Verhältnis von Fluoreszenz im Kern zu der im Zytoplasma wurde durch die Formel $(N - C)/(N + C) \times 100$ berechnet, wobei N die Fluoreszenzintensität im Zellkern und C die Intensität im Zytoplasma ist.

Bei den Mutanten, bei denen die Aminosäure K149 bzw. R164 in der TEA-Domäne von Tec1 zu Alanin mutiert ist (GFP-Tec1^{K149A}; BHUM 1403 und GFP-Tec1^{R164A}; BHUM 1399), sowie allen drei Doppelmутanten (GFP-Tec1^{K149A, K318A}; BHUM 1682, GFP-Tec1^{K149A, R319A}; BHUM 1653 und GFP-Tec1^{R164A, R319A}; BHUM 1680), war eine Besonderheit zu beobachten. Bei diesen Proteinen war bei ca. 40 % der Zellen ein helles punktuell Signal an der Kernperipherie zu sehen (Abb. 2.14). Worum es sich dabei handelt ist unklar, es könnte allerdings in Zusammenhang mit der bereits beschriebenen punktuellen Lokalisierung von GFP-Tec1^{AS 125–199} stehen (Abb. 2.3).

Zusätzlich zu den Lokalisierungsstudien wurden die Punktmutanten auch auf ihre Fähigkeit zur TCS-Aktivierung *in vivo* getestet. Für die Tec1-Varianten Tec1^{K149A} (BHUM 1674) und Tec1^{R164A} (BHUM 1484) ist aus Abschnitt 2.1.4 bereits bekannt, dass sie keine Aktivierung mehr bewirken können (Abb. 2.11, Abb. 2.15). Hier wurden nun auch Tec1^{K318A} (BHUM 1676) und Tec1^{R319A} (BHUM 1678), sowie die Doppelmутanten Tec1^{K149A, K318A} (BHUM 1842), Tec1^{K149A, R319A} (BHUM 1843) und Tec1^{R164A, R319A} (BHUM 1841) untersucht. Entgegen den Erwartungen war die TCS-

Aktivierung von Tec1^{K318A} (BHUM 1676) und Tec1^{R319A} (BHUM 1678) mit 122 bzw. 136 % sogar höher als die des Wildtyp Proteins. Alle drei Doppelmutanten verhielten sich in dem Versuch wie erwartet, denn sie zeigten keine Aktivität. Dies ist vor allem darauf zurückzuführen, dass die Mutationen in der TEA Domäne die TCS-Bindung verhindern (Abb. 2.15).

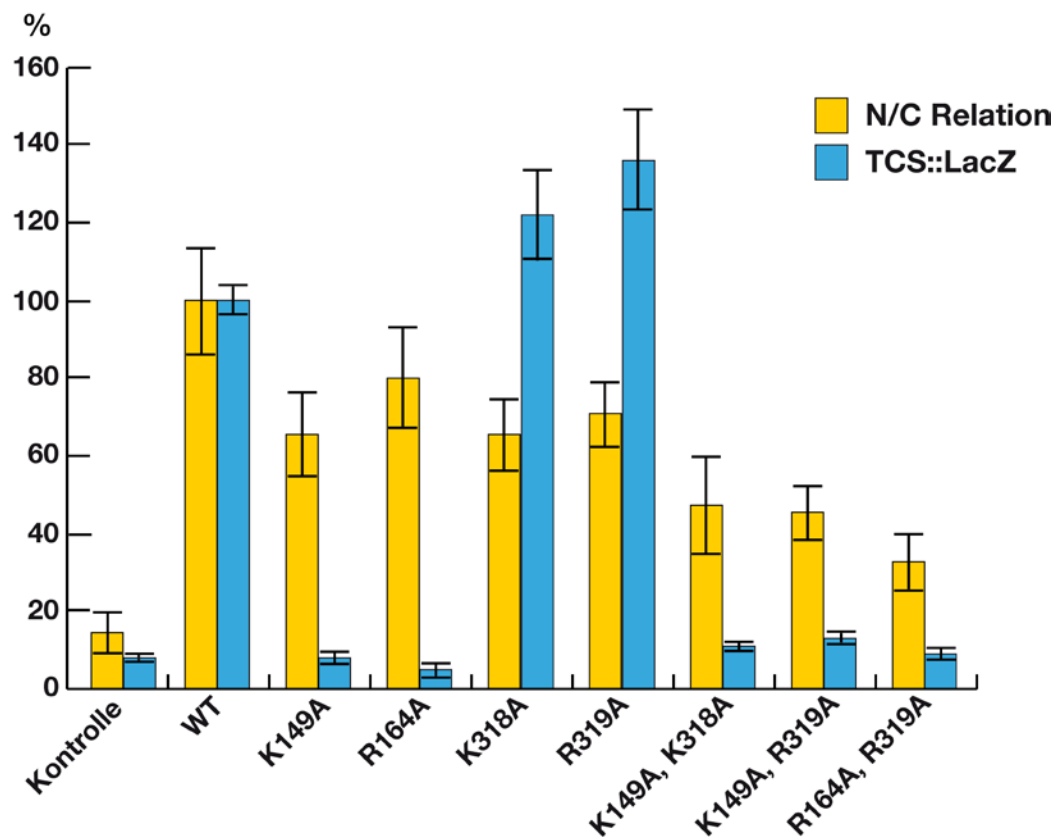


Abb. 2.15: Vergleich der Effekte der Punktmutationen auf die Kernlokalisierung bzw. die TCS-Aktivierung von Tec1. Gelbe Balken: Relative Werte der nukleozytoplasmatischen Relation von GFP (BHUM 1156) (Kontrolle), GFP-Tec1 (BHUM 1196) (WT), GFP-Tec1^{K149A} (BHUM 1403), GFP-Tec1^{R164A} (BHUM1399), GFP-Tec1^{K318A} (BHUM 1651), GFP-Tec1^{R319A} (BHUM 1652), GFP-Tec1^{K149A, K318A} (BHUM1682), GFP-Tec1^{K149A, R319A} (BHUM 1653) und GFP-Tec1^{R164A, R319A} (BHUM 1680) im Hefestamm YHUM 1889 (*tec1Δ, NUP49::tagRFP*). Das Verhältnis von Fluoreszenz im Kern zu der im Zytoplasma wurde durch die Formel $(N-C)/(N+C) \times 100$ berechnet. Für die relativen Werte wurde das Wildtyp GFP-Tec1 auf 100 % gesetzt und die anderen Werte relativ dazu berechnet. Blaue Balken: Messung der relativen β -Galaktosidaseaktivität im Stamm YHUM 1363 (*tec1Δ::HIS3, TCS-CYC1-lacZ::URA3*), der mit folgenden Plasmiden transformiert wurde: B2439 (Leerplasmid YCplac111) (Kontrolle), BHUM 0697 (Tec1) (WT), BHUM 1674 (Tec1^{K149A}), BHUM 1484 (Tec1^{R164A}), BHUM 1676 (Tec1^{K318A}), BHUM 1678 (Tec1^{R319A}), BHUM 1842 (Tec1^{K149A, K318A}), BHUM 1843 (Tec1^{K149A, R319A}) und BHUM 1841 (Tec1^{R164A, R319A}). Die Werte sind relativ zu Wildtyp-Tec1 (100 %) berechnet.

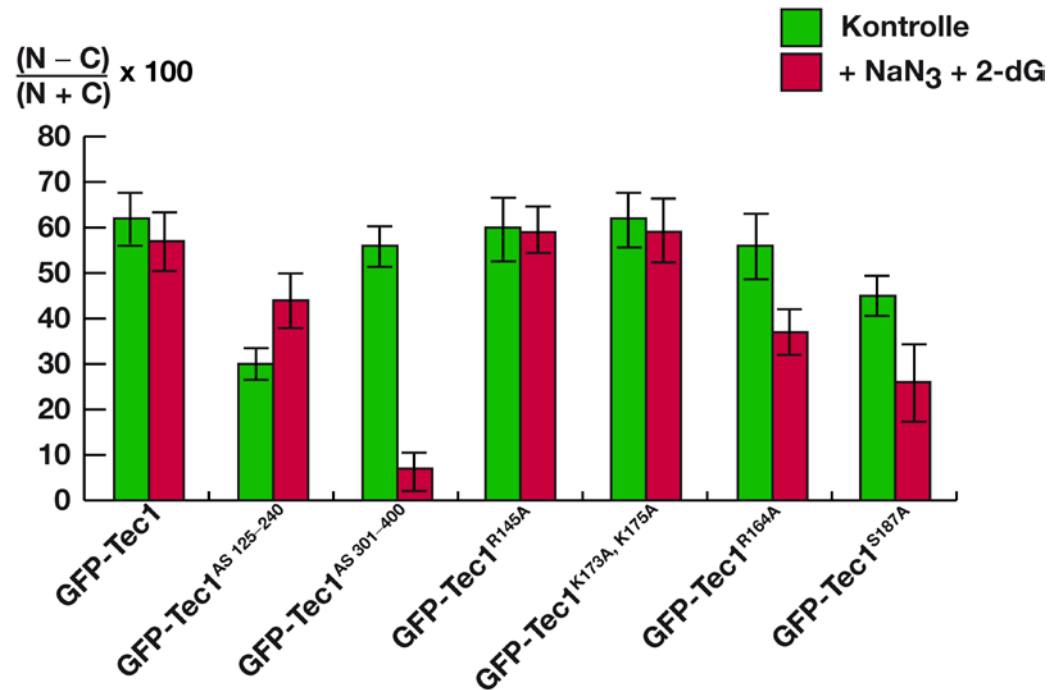
2.1.7. Die beiden NLS-enhaltenden Fragmente von Tec1 verhalten sich unterschiedlich nach Hemmung des rezeptorvermittelten Kerntransportes

Um die Transportgeschwindigkeit von Proteinen in den Zellkern zu untersuchen, kann man die ATP- und GTP-Produktion von Hefezellen durch Zugabe von 10 mM Natriumazid und 10 mM 2-Desoxyglukose reversibel hemmen. Das Fehlen von GTP bewirkt, dass die Kerntransportprozesse nicht mehr aufrecht erhalten werden können und Proteine nicht mehr in den Zellkern transportiert werden können. Nach ca. 15 Minuten stellt sich ein neues Gleichgewicht ein. Werden die Zellen danach in frisches Medium überführt, können sie die Energieproduktion wieder aufnehmen und die Transportprozesse wieder in Gang bringen. Die Zeit, nach der die ursprüngliche Fluoreszenzintensität im Zellkern wieder hergestellt ist, kann dann gemessen werden (Shulga *et al.*, 1996).

Wendet man diese Methode bei Hefezellen, die GFP-Tec1 (BHUM 1196) exprimieren an, stellt man fest, dass auch nach mehr als 30-minütiger Inkubation mit Natriumazid und 2-Desoxyglukose (in Medium ohne Glukose) keine Veränderung der Lokalisierung erkennbar ist (Abb. 2.16A). Die Quantifizierung der nukleozytoplasmatischen Relation bestätigt dieses Ergebnis, es besteht nur ein minimaler Unterschied zwischen der Lokalisierung von GFP-Tec1 in Zellen ohne und mit dem metabolischen Gift (Abb. 2.16A).

Untersucht man das Verhalten der Tec1-Fragmente, die jeweils nur die NLS1 bzw. NLS2 enthalten (GFP-Tec1^{AS 125–240}; BHUM 1415 und GFP-Tec1^{AS 301–400}; BHUM 1418), so stellt man fest, dass das NLS1-enhaltende Fragment (BHUM 1415) in Anwesenheit von Natriumazid und 2-Desoxyglukose ebenfalls im Zellkern bleibt und die Quantifizierung sogar einen leicht erhöhten Wert im vergifteten Zustand ergibt (Abb. 2.16A). Ganz anders verhielt sich hingegen GFP-Tec1^{AS 301–400} (BHUM 1418) mit der NLS2. Während das Protein in normalem Medium deutlich im Zellkern lokalisierte, war schon wenige Minuten nach Zugabe des metabolischen Giftes eine Gleichverteilung des Proteins über die ganze Zelle sichtbar (Abb. 2.16B). Hier war also der ursprünglich für das gesamte Tec1-Protein erwartete Effekt des Verlustes von rezeptorvermitteltem Transport durch metabolische Vergiftung zu beobachten.

A



B

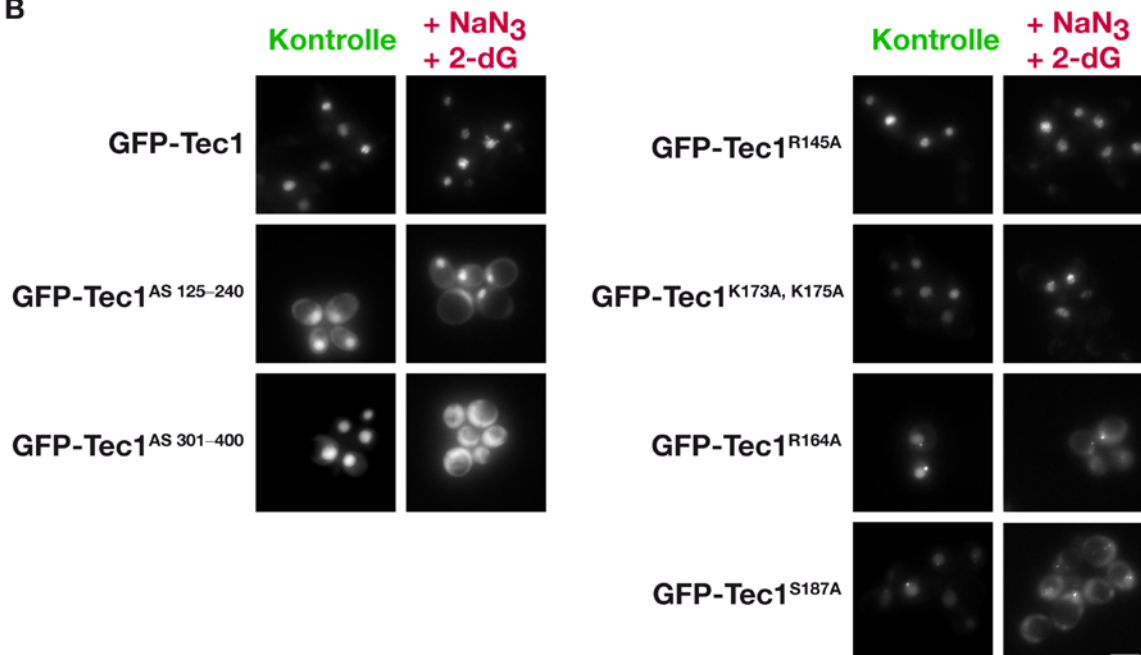


Abb. 2.16: Auswirkung der metabolischen Vergiftung auf die Lokalisierung verschiedener GFP-Tec1-Konstrukte. Die Proteine GFP-Tec1 (BHUM 1196), GFP-Tec1^{AS 125-240} (BHUM 1415), GFP-Tec1^{AS 301-400} (BHUM 1418), GFP-Tec1^{R145A} (BHUM 1405), GFP-Tec1^{K173A, K175A} (BHUM 1400), GFP-Tec1^{R164A} (BHUM 1399) und GFP-Tec1^{S187A} (BHUM 1402) wurden im Hefestamm YHUM 1889 (*tec1Δ*, *NUP49::tagRFP*) durch Fluoreszenzmikroskopie auf ihre Lokalisierung in Abwesenheit (Kontrolle) bzw. Gegenwart von 10 mM Natriumazid und 10 mM 2-Desoxyglukose (+ 10 mM NaN₃ + 10 mM 2-dG) untersucht. A) Balkendiagramm der Werte der nukleozytoplasmatischen Relation, die jeweils mit der Formel $(N - C)/(N + C) \times 100$ berechnet wurden, wobei N die Fluoreszenzintensität im Zellkern und C die Intensität im Zytoplasma ist. B) Mikroskopische Aufnahmen der Fluoreszenz von GFP nach Anregung bei 395 nm (GFP) und das zugehörige Durchlichtbild (DIC). Der Maßstab entspricht 5 μ m.

Ein plausibler Grund dafür, dass sowohl GFP-Tec1 (BHUM 1196) als auch GFP-Tec1^{AS 125–240} (BHUM 1415) im Zellkern bleiben, auch wenn kein rezeptorvermittelter Transport mehr stattfindet, könnte die Bindung des Proteins an die DNA durch die TEA-Domäne sein. Um diese Hypothese zu testen, wurden Punktmutanten, welche die DNA-Bindung an TCS-Elemente verhindern (GFP-Tec1^{R164A}; BHUM 1399 und GFP-Tec1^{S187A}; BHUM 1402) und solche, die keinen Effekt auf die DNA-Bindung haben (GFP-Tec1^{R145A}; BHUM 1405 und GFP-Tec1^{K173A, K175A}; BHUM 1400) untersucht (Abb. 2.16A, B). Die Punktmutanten, die genauso stark wie das Wildtypprotein an TCS-Elemente binden können, verhielten bei auch nach metabolischer Vergiftung wie der Wildtyp. Die Mutanten hingegen, die nicht mehr die TCS-DNA binden können, zeigten nach Hemmung des rezeptorvermittelten Transports eine geringere Akkumulation im Zellkern (Abb. 2.16A, B). Dies deutet darauf hin, dass Tec1 über seine TEA-Domäne im Zellkern „verankert“ wird und nicht so leicht wieder hinausgelangen kann, z. B. durch Diffusion.

2.1.8. Die NLS2 von Tec1 vermittelt rezeptorabhängigen Kernimport

Eine andere Methode, mit der man die Geschwindigkeit von Transportprozessen messen kann, nennt sich „**F**luorescence **R**ecovery **A**fter **P**hotobleaching“ (FRAP). Dabei werden an einer bestimmten Stelle in der Zelle mit einem Laserstrahl die fluoreszierenden Moleküle gebleicht. Anschließend wird die Regeneration der Fluoreszenz durch von einem anderen Bereich der Zelle kommende fluoreszierende Moleküle verfolgt. In dieser Arbeit wurde das im Zellkern vorhandene GFP (BHUM 1156), GFP-Tec1^{AS 125–240} (BHUM 1415), bzw. GFP-Tec1^{AS 301–400} (BHUM 1418) um 40–50 % gebleicht und die Regeneration der Fluoreszenz ca. 95 Sekunden lang verfolgt. Dies wurde auch bei Zellen gemacht, bei denen der rezeptorvermittelte Transport durch Natriumazid und 2-Desoxyglukose gehemmt war.

Bei freiem GFP konnte man eine schnelle Wiederherstellung der Fluoreszenz im Zellkern beobachten, die schon nach 60 Sekunden wieder auf dem Ausgangswert war (Abb. 2.17A). Da sich GFP in der Zelle und in den Zellkern nur durch Diffusion bewegt, war in Zellen, bei denen der rezeptorvermittelte Transport gehemmt war, kein Effekt auf die Regeneration der Fluoreszenz zu beobachten (Abb. 2.17A). Eine Quantifizierung der prozentualen Regeneration, also um wie viel Prozent die Fluoreszenz nach dem Bleichen wieder ansteigt, zeigt ebenfalls, dass nur ein kleiner Unterschied zwischen den beiden Messergebnissen besteht (Abb. 2.17D).

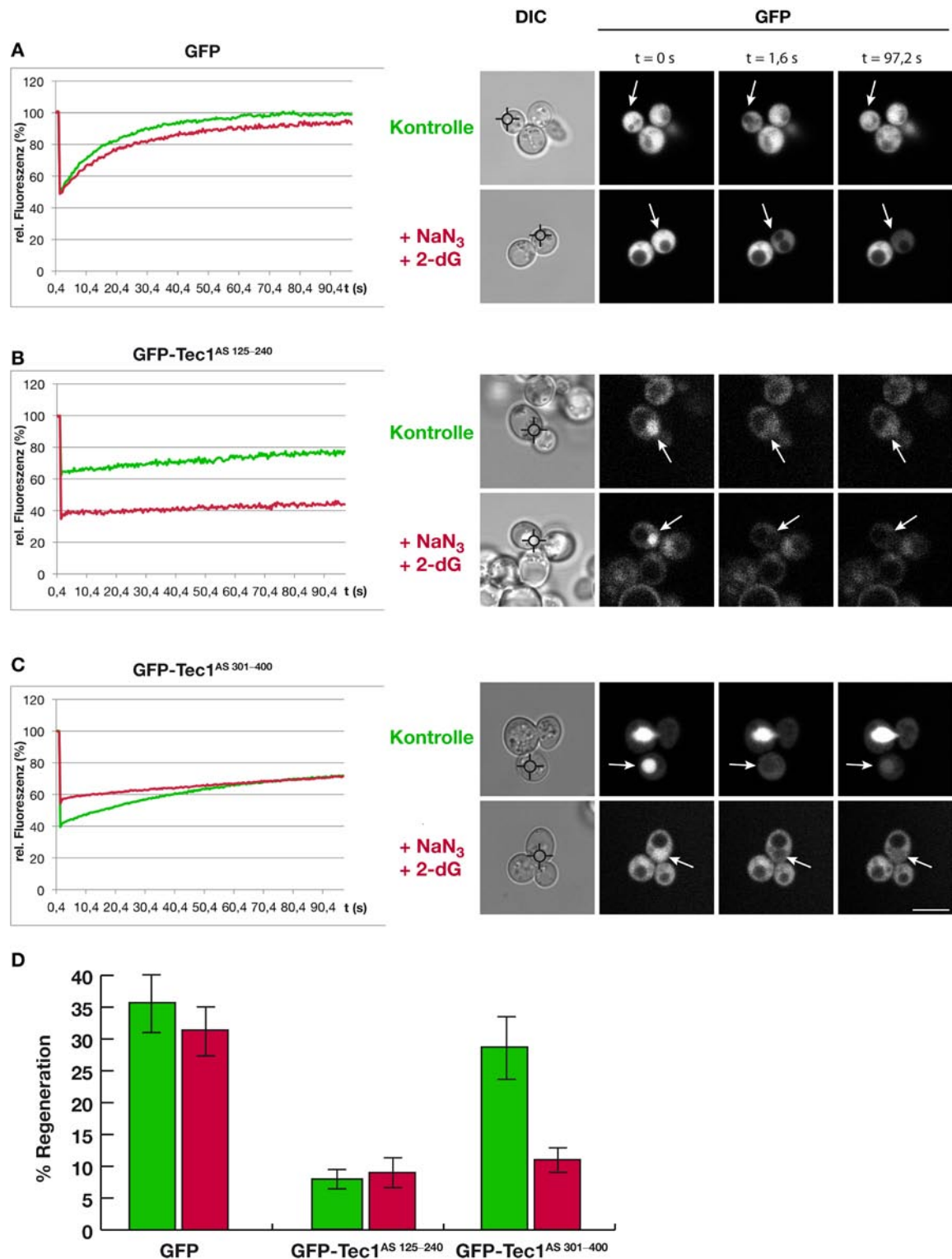


Abb. 2.17: FRAP („Fluorescence Recovery After Photobleaching“) der Fluoreszenz im Zellkern. Diese kinetische Untersuchung wurde mit den Konstrukten GFP (BHUM 1156) (A), GFP-Tec1^{AS 125-240} (BHUM 1415) (B) und GFP-Tec1^{AS 301-400} (BHUM 1418) (C), die in YHUM 1889 (*tec1Δ*, *NUP49::tagRFP*) hergestellt wurden, durchgeführt. Der Graph zeigt jeweils die relative Fluoreszenz des gebleichten Bereiches in der Zelle über einen Zeitraum von 97,2 Sekunden, wobei die Fluoreszenzintensität vor dem Bleichen als 100 % definiert wurde. Grüne Kurve: Zellen ohne NaN₃ (Natriumazid) und 2-dG (2-Desoxyglukose), rote Kurve: nach 20-minütiger Inkubation der Zellen mit 10 mM NaN₃ und 10 mM 2-dG. Rechts neben den Graphen sind ein DIC-Bild und ein GFP-Bild zu den Zeitpunkten t = 0 s (vor dem Bleichen), t = 1,6 s

(direkt nach dem Bleichen des Zellkerns) und $t = 97,2 \text{ s}$ (letzte Aufnahme der Regenerationszeit) der GFP-(Fusions)-Proteine ohne und mit 10 mM NaN_3 und 10 mM 2-dG gezeigt. Der Maßstab entspricht $5 \mu\text{m}$. Das Fadenkreuz im DIC-Bild, bzw. Pfeile in den Fluoreszenzbildern zeigen jeweils die Stelle an, die durch den Laser gebleicht wurde. D) Vergleich der prozentualen Regeneration der Fluoreszenz im Zellkern ohne (grün) und mit (rot) NaN_3 und 2-dG.

Bei dem NLS1-enthaltenden Fragment GFP-Tec1^{AS 125–240} (BHUM 1415) war so gut wie keine Regeneration der Fluoreszenz zu beobachten und die Regenerationskurve ist dementsprechend sehr flach (Abb. 2.17B). Wurde der rezeptorvermittelte Transport gehemmt, war ebenfalls keine Erhöhung der Fluoreszenzintensität nach dem Bleichen zu sehen (Abb. 2.17B). Die Quantifizierung ergab, dass in beiden Fällen fast keine Bewegung der GFP-Tec1^{AS 125–240} Moleküle in den Zellkern auftrat (Abb. 2.17D). Da allerdings die Fluoreszenz in dem für dieses Experiment verwendeten konfokalen Mikroskop bei diesem Fusionsprotein sehr schwach war und daher nur wenige fluoreszierende Moleküle sichtbar waren, welche die Regeneration hätten bewirken können, kann man für die Transportvorgänge bzw. die Transportgeschwindigkeit dieses Moleküls nur bedingte Aussagen treffen.

Das NLS2-enthaltende Fragment GFP-Tec1^{AS 301–400} (BHUM 1418) fluoreszierte stärker und konnte daher gut gemessen werden. In unvergifteten Zellen war nach dem Bleichen eine deutliche Regeneration der Fluoreszenz im Zellkern sichtbar (Abb. 2.17C, D). Die prozentuale Regeneration der Fluoreszenz liegt bei 29% und ist mit der für GFP (36%) vergleichbar (Abb. 2.17D). Die Kurve von GFP-Tec1^{AS 301–400} ist allerdings deutlich flacher als die von GFP und damit die Geschwindigkeit der Regeneration um einiges langsamer. Wurde der rezeptorvermittelte Transport durch Zugabe von Natriumazid und 2-Desoxyglukose gehemmt, war die Wiederkehr der Fluoreszenzintensität nach dem Bleichen durch GFP-Tec1^{AS 301–400} erkennbar gehemmt und die prozentuale Regeneration dementsprechend deutlich geringer (11%) (Abb. 2.17C, D). Daraus lässt sich schließen, dass GFP-Tec1^{AS 301–400} (BHUM 1418) hauptsächlich über rezeptorvermittelten Transport in den Zellkern gelangt.

2.2 Identifizierung der für den Kerntransport von Tec1 verantwortlichen Karyopherine

2.2.1. Das Fehlen eines einzelnen Karyopherins verhindert die Kernlokalisierung der GFP-Tec1-Fragmente nicht

Um zu untersuchen, welche Karyopherine für den Kernimport von Tec1 verantwortlich sind, stand eine Reihe von Hefestämmen zur Verfügung, bei denen jeweils eines der Karyopheringene deletiert war bzw. als temperatursensitive Variante vorlag: YHUM 1041 (Wildtyp), YHUM 1043 (*kap123Δ*), YHUM 1044 (*nmd5Δ*), YHUM 1045 (*pdr6Δ*), YHUM 1046 (*sxm1Δ*), YHUM 1047 (*kap114Δ*), YHUM 1035 (*mtr10Δ*), YHUM 1036 (*kap104Δ*), YHUM 1037 (*pse1^{ts}*), YHUM 1038 (*kap95^{ts}*) und YHUM 1040 (*srp1^{ts}*). Diese Hefestämme wurden jeweils mit den Plasmiden BHUM 1415 (GFP-Tec1^{AS 125–240}) bzw. BHUM 1418 (GFP-Tec1^{AS 301–400}) transformiert und die Lokalisierung der Konstrukte im Fluoreszenzmikroskop untersucht. Die Deletionsstämme wurden (mit Ausnahme von YHUM 1035 und YHUM 1036) bei 30 °C bis zur exponentiellen Phase in Flüssigmedium kultiviert und anschließend mikroskopiert. Die temperatursensitiven Stämme wurden bei Raumtemperatur (ca. 23 °C) inkubiert und bis zur exponentiellen Phase herangezogen. Anschließend wurden sie für 2–3 Stunden bei der jeweiligen restriktiven Temperatur inkubiert (36–37 °C). Die Zellen der einzelnen Stämme wurden zunächst bei permissiver Temperatur mikroskopiert und dann erneut nach Inkubation bei der restriktiven Temperatur. Da die Stämme YHUM 1035 und YHUM 1036 durch Deletion von *MTR10* bzw. *KAP104* temperatursensitiv wurden, sind sie genau wie die Stämme mit den temperatursensitiven Karyopherinvarianten behandelt worden.

Für das Protein GFP-Tec1^{AS 125–240} (BHUM 1415) war bei den Deletionsmutanten keine Veränderung der Lokalisierung im Vergleich zum Wildtyp festzustellen (Abb. 2.18A, B). Auch in den Stämmen mit den temperatursensitiven Varianten der essentiellen Karyopherine, war weder bei permissiver noch bei restriktiver Temperatur ein deutlicher Unterschied zum Wildtypstamm erkennbar (Abb. 2.18B, C).

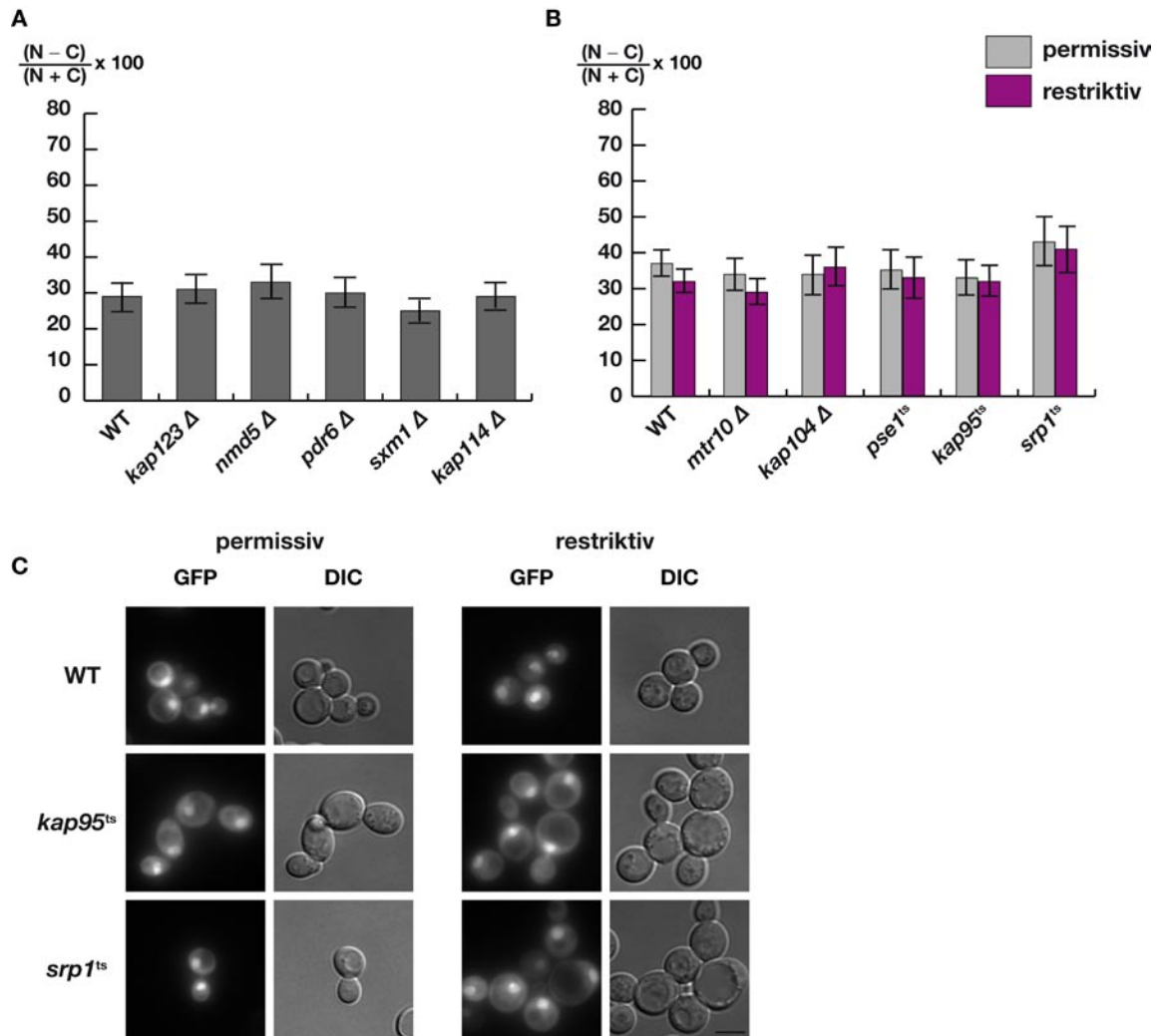


Abb. 2.18: In vivo-Analyse der Lokalisierung von GFP-Tec1^{AS 125–240}. A) Nukleozytoplasmatische Relation von GFP-Tec1^{AS 125–240} (BHUM 1415) in den Stämmen YHUM 1041 (Wildtyp), YHUM 1043 (*kap123Δ*), YHUM 1044 (*nmd5Δ*), YHUM 1045 (*pdr6Δ*), YHUM 1046 (*sxm1Δ*), YHUM 1047 (*kap114Δ*). B) Nukleozytoplasmatische Relation von GFP-Tec1^{AS 125–240} (BHUM 1415) in YHUM 1041 (Wildtyp) und den temperatursensitiven Stämmen YHUM 1035 (*mtr10Δ*), YHUM 1036 (*kap104Δ*), YHUM 1037 (*pse1^{ts}*), YHUM 1038 (*kap95^{ts}*), YHUM 1040 (*srp1^{ts}*) jeweils bei permissiver und restriktiver Temperatur. C) Fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen von GFP-Tec1^{AS 125–240} (BHUM 1415) in YHUM 1041 (Wildtyp), YHUM 1038 (*kap95^{ts}*) und YHUM 1040 (*srp1^{ts}*) bei permissiver und restriktiver Temperatur. Die Fluoreszenz von GFP nach Anregung bei 395 nm (GFP) und das zugehörige Durchlichtbild (DIC) sind gezeigt. Der Maßstab entspricht 5 µm.

Sehr ähnlich verhielt sich auch das andere Fusionsprotein, GFP-Tec1^{AS 301–400} (BHUM 1418). In den Deletionsmutanten war wiederum kein Effekt auf die Kernlokalisierung sichtbar (Abb. 2.19A, B), während bei den temperatursensitiven Mutantenstämmen eine schwächere Kernlokalisierung in YHUM 1038 (*kap95^{ts}*) zu erkennen war (Abb. 2.19B, C). Allerdings war dies sowohl bei der permissiven als auch bei der restriktiven Temperatur der Fall, was darauf hindeutet, dass das mutierte Kap95-Protein bereits bei

niedrigen Temperaturen einen Funktionsverlust hat. In allen anderen Mutanten war die Lokalisierung unverändert.

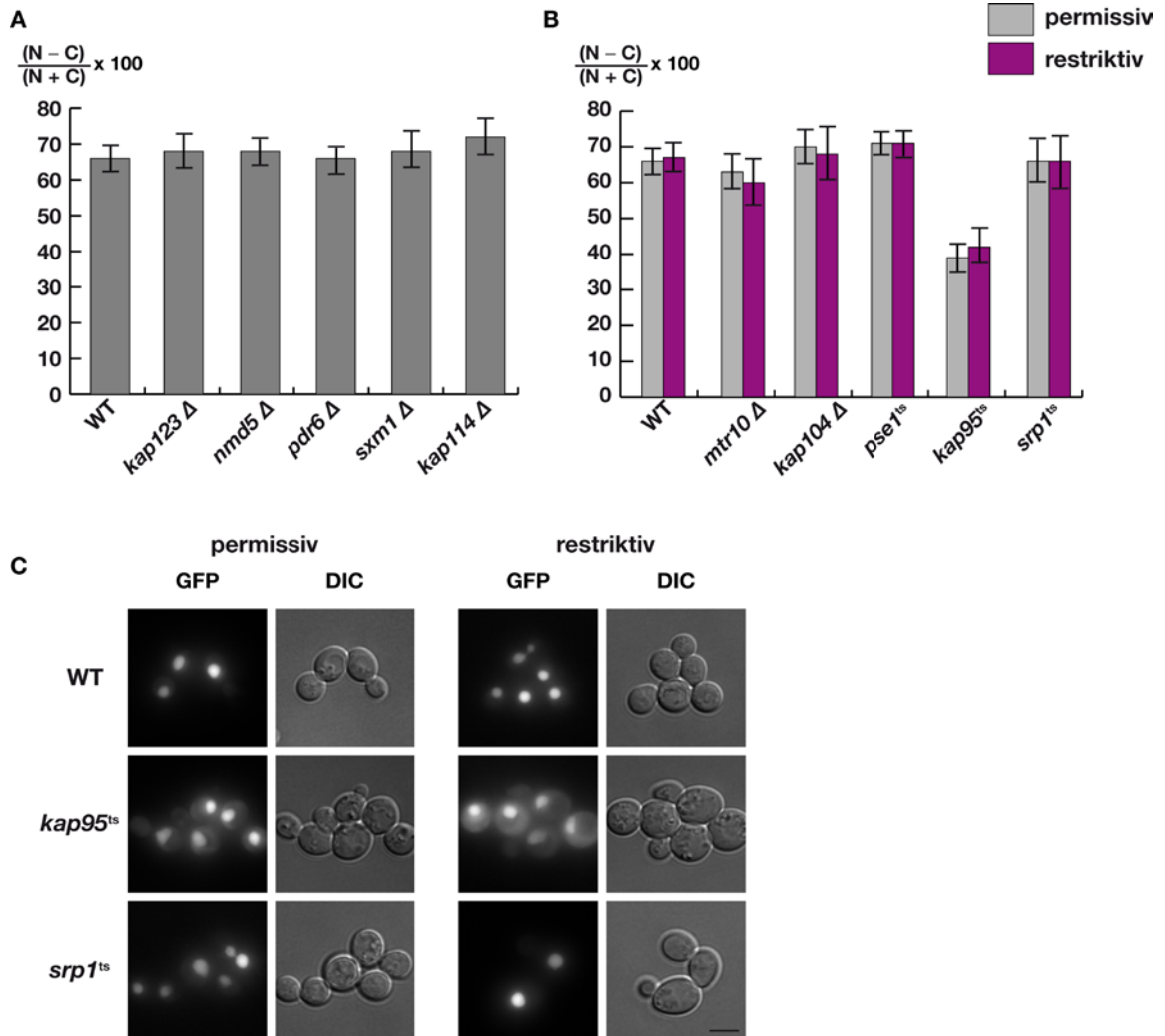


Abb. 2.19: In vivo-Analyse der Lokalisierung von GFP-Tec1^{AS 301-400}. A) Nukleozytoplasmatische Relation von GFP-Tec1^{AS 301-400} (BHUM 1418) in den Stämmen YHUM 1041 (Wildtyp), YHUM 1043 (*kap123*Δ), YHUM 1044 (*nmd5*Δ), YHUM 1045 (*pdr6*Δ), YHUM 1046 (*sxm1*Δ), YHUM 1047 (*kap114*Δ). B) Nukleozytoplasmatische Relation von GFP-Tec1^{AS 301-400} (BHUM 1418) in YHUM 1041 (Wildtyp) und den temperatursensitiven Stämmen YHUM 1035 (*mtr10*Δ), YHUM 1036 (*kap104*Δ), YHUM 1037 (*pse1*^{ts}), YHUM 1038 (*kap95*^{ts}), YHUM 1040 (*srp1*^{ts}) jeweils bei permissiver und restriktiver Temperatur. C) Fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen von GFP-Tec1^{AS 301-400} (BHUM 1418) in YHUM 1041 (Wildtyp), YHUM 1038 (*kap95*^{ts}) und YHUM 1040 (*srp1*^{ts}) bei permissiver und restriktiver Temperatur. Die Fluoreszenz von GFP nach Anregung bei 395 nm (GFP) und das zugehörige Durchlichtbild (DIC) sind gezeigt. Der Maßstab entspricht 5 µm.

Die Tatsache, dass in keiner der Mutanten ein kompletter Verlust der Kernlokalisierung von GFP-Tec1^{AS 125–240} bzw. GFP-Tec1^{AS301–400} festzustellen war, legt die Vermutung nahe, dass nicht nur ein bestimmtes Karyopherin für den NLS1- bzw. NLS2-vermittelten Kernimport verantwortlich ist. Es sind daher wahrscheinlich jeweils mindestens zwei Importine zuständig, deren Funktion unter den gegebenen Bedingungen redundant ist.

Eines der essentiellen Karyopherine, Pse1, welches unter anderem für den Kernimport des mit Tec1 interagierenden Transkriptionsfaktors Ste12 verantwortlich ist, wurde zusätzlich auf eine andere Art getestet, ob es für den Kerntransport mittels NLS2 verantwortlich sein könnte. Bei dieser Methode handelt es sich um die so genannte „TEV-Protease induzierte Protein Instabilisierung“, kurz TIPI (Taxis *et al.*, 2009). Dabei wird ein bestimmtes Protein, das man markiert hat, zu einem bestimmten Zeitpunkt (in diesem Fall in Anwesenheit von Galaktose und Abwesenheit von Glukose) ubiquitiniert und durch das 26S-Proteasom degradiert. Das in dieser Arbeit verwendete System wird im Folgenden anhand des konkreten Beispiels Pse1 erläutert: Das Gen der TEV-Protease des Tabak-Ätz-Virus wird in Hefezellen integriert und von einem Galaktose-induzierbaren Promotor exprimiert (YHUM 1946; *GALI(P)::TEV*). Des Weiteren wird in diesem Stamm eine DNA-Kassette vor das Gen des Proteins, das man später in der Zelle depletieren möchte, also in diesem Fall *PSE1*, integriert. Diese Kassette enthält den Resistenzmarker gegen das Antibiotikum Nurseothricin (zur Selektion), das Gen für einen Transaktivator (*tTA*), den *tetO₇*-Promotor (*tetO₇(P)*), das Gen für GFP, das inaktive Degron *TDegF* und einen 2HA-Tag (Renicke, 2010). Das Gen *PSE1* wird also von dem *tetO₇*-Promotor reguliert, der durch den Transaktivator aktiviert wird. In Anwesenheit des Antibiotikums Doxycyclin dissoziiert der Transaktivator jedoch vom Promotor ab und die Expression von *PSE1* wird auf ein basales Niveau reduziert. Die Depletion des Fusionsproteins GFP-TDegF-2HA-Pse1 wird induziert, wenn die Zellen auf Medium mit Galaktose und ohne Glukose wachsen. Die Galaktose stimuliert die Expression des Gens der TEV-Protease, die an der im Degron des Fusionsproteins enthaltenen TEV-Protease-Schnittstelle schneidet. Als Folge wird die destabilisierende Aminosäure Phenylalanin des Degrons am N-Terminus des geschnittenen Proteins exponiert. Die Ubiquitin-Ligase Ubr1 erkennt diese Aminosäure und markiert das Protein durch Polyubiquitinierung zum Abbau durch das 26S-Proteasom (Bachmair *et al.*, 1986; Johnson *et al.*, 1995; Xia *et al.*, 2008). Wachsen die Zellen also auf Medium mit Glukose, wird das Gen *PSE1* exprimiert und das Protein

ist stabil. In Medium mit Galaktose und Doxycyclin wird das markierte Pse1 abgebaut und gleichzeitig die Neusynthese des Proteins stark vermindert, da der Transaktivator nicht mehr wirkt. Folglich wird Pse1 effizient aus der Zelle depletiert.

Um zu überprüfen, ob Pse1 in dem Hefestamm YHUM 1976 (*tetO₇(P)::GFP-TDegF-2HA-PSE1*) in Anwesenheit von Galaktose und Doxycyclin effizient depletiert wird, wurde ein Tropftest durchgeführt. Da Pse1 für die Zellen essentiell ist, sollten sie daher auf solchem Medium nicht wachsen können. Die Zellen des Stamms YHUM 1976 wurden in Flüssigmedium (mit Glukose) herangezogen, in verschiedenen Verdünnungsstufen auf Festmedium mit Glukose, Galaktose oder Galaktose und Doxycyclin getropft und 3 Tage lang bei 30 °C inkubiert. Als Vergleich diente der Ausgangsstamm YHUM 1946 (*GALI(P)::TEV*). Auf Medium mit Glukose konnten beide Stämme gleich gut wachsen (Abb. 2.20A). Auf Medium mit Galaktose war auch kein Unterschied zwischen YHUM 1976 und YHUM 1946 zu erkennen, wobei beide Stämme etwas langsamer gewachsen sind als auf Medium mit Glukose (Abb. 2.20A). War jedoch zusätzlich Doxycyclin im diesem Medium, so konnte der Stamm YHUM 1976 nicht wachsen, während das Antibiotikum keinen Einfluss auf das Wachstumsverhalten von YHUM 1946 hatte (Abb. 2.20A). In den Zellen des Stamms YHUM 1976 wurde also Pse1 unter diesen Bedingungen effizient depletiert.

Der Abbau des Proteins Pse1 in YHUM 1976 konnte auch in einem Immunoblot gezeigt werden, wo bereits zwei Stunden nach dem Wechsel von Medium mit Glukose zu Medium mit Galaktose und Doxycyclin eine deutliche Reduktion der Proteinmenge sichtbar war und weitere zwei Stunden später war so gut wie kein Pse1 mehr zu detektieren (Abb. 2.20B). Auch im Mikroskop ließ sich der Abbau gut verfolgen. In Medium mit Glukose war das mit der Degradationskassette versehene Pse1 in den Zellen zu sehen, da diese Kassette auch GFP beinhaltet. Pse1 lokalisierte hauptsächlich an der Kernhülle, aber auch im Zytoplasma und im Kern. In Medium mit Galaktose und Doxycyclin war nach vier Stunden keine Fluoreszenz mehr zu detektieren (Abb. 2.20C). Um nun zu überprüfen, ob die Depletion des Importins Pse1 einen Einfluss auf die Lokalisierung von Tec1^{AS 301–400} hat, wurde dieses Fragment mit dem rot fluoreszierenden Protein mCherry fusioniert (mCherry-Tec1^{AS 301–400}, BHUM 1735) und auf einem Plasmid in den Stamm YHUM 1976 eingebracht. Sowohl in Medium mit Glukose als auch nach 4 Stunden in Medium mit Galaktose und Doxycyclin lokalisierte dieses Protein jedoch im Zellkern (Abb. 2.20D). Folglich konnte auch mit dieser

Methode noch einmal gezeigt werden, dass das Karyopherin Pse1 nicht notwendig für die NLS2-vermittelte Kernlokalisierung ist.

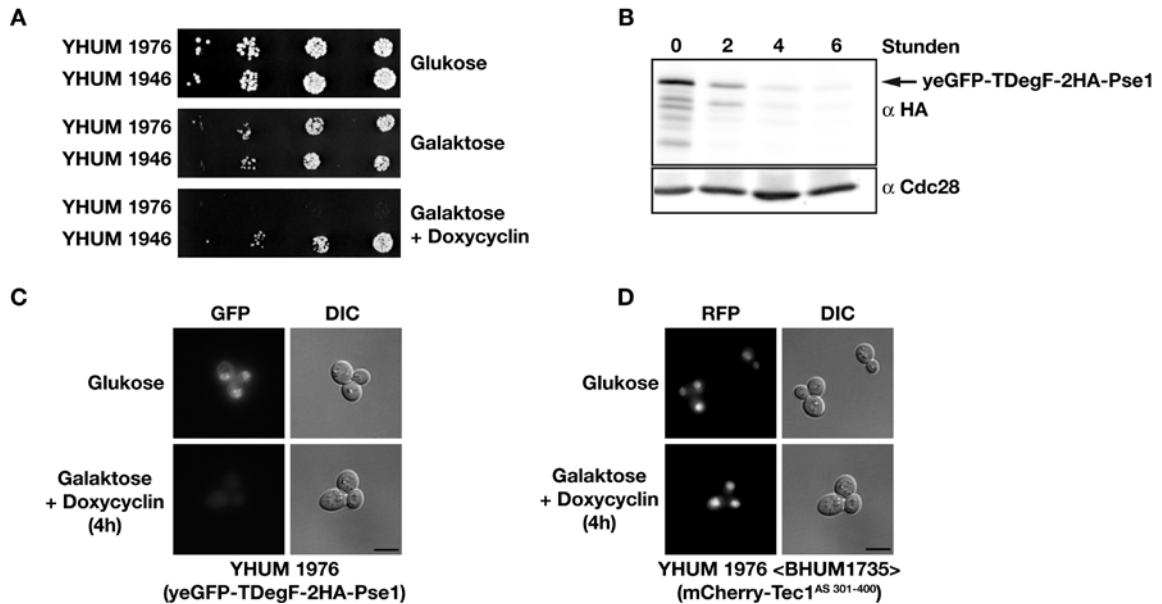


Abb. 2.20: TEV-Protease induzierte Proteindegradation von Pse1. A) Wachstumstest der Stämme YHUM 1946 (*GALI(P)-TEV*) und YHUM 1976 (*GALI(P)-p14^{D122Y}-TEV^{234 Stopp}; tTA, NatNT2, tetO₇(P)-yeGFP-TDegF-2HA::PSE1*) auf YEPD (Glukose), YEPG (Galaktose) bzw. YEPG + Doxycyclin. Hefezellen der entsprechenden Stämme wurden in Flüssigmedium angezogen und anschließend in verschiedenen Verdünnungsstufen auf die angegebenen Festmedien getropft. Die Verdünnung wird von links nach rechts schwächer. Nach einer Inkubation bei 30 °C für ca. 3 Tage wurden die Platten fotografiert. B) Immunoblot mit anti-HA und anti-Cdc28 Antikörpern. Der Stamm YHUM 1976 wurde in Flüssigmedium bis zur exponentiellen Phase herangezogen und dann 2 µg/ml Doxycyclin hinzugegeben. Nach 0, 2, 4 und 6 Stunden wurde jeweils eine Probe genommen, die Proteine extrahiert und in einem SDS-Polyacrylamidgel aufgetrennt. Der Immunoblot mit anti-Cdc28 Antikörpern diente als interne Ladekontrolle. C) Fluoreszenzmikroskopie des Stammes YHUM 1976 nach Inkubation in Medium mit Glukose bzw. mit Galaktose und Doxycyclin für jeweils 4 Stunden. Zu sehen ist die GFP-Fluoreszenz nach Anregung bei 395 nm (GFP) und das zugehörige Durchlichtbild (DIC). D) Fluoreszenzmikroskopie des Stammes YHUM 1976, der mit dem Plasmid BHUM 1735 (mCherry-Tec1^{AS 301-400}) transformiert ist unter den gleichen Bedingungen wie in C). Zu sehen ist die Fluoreszenz von RFP nach Anregung bei 555 nm (RFP) und die zugehörigen Durchlichtbilder (DIC). Der Maßstab entspricht 5 µm.

2.2.2 MBP-Tec1 interagiert *in vitro* mit verschiedenen Importinen

Eine andere Möglichkeit, die für den Kerntransport von Tec1 verantwortlichen Karyopherine zu identifizieren, ist eine biochemische Interaktionsstudie. In dieser Arbeit wurden *in vitro*-Interaktionstests durchgeführt, um die mit Tec1, Tec1^{AS 125–240} bzw. Tec1^{AS 301–400} interagierenden Importine zu identifizieren. Dazu wurden die elf *S. cerevisiae*-Importine als GST-Fusionsproteine aus *E. coli* gereinigt. Des Weiteren wurde MBP-Tec1-His₆ ebenfalls aus *E. coli* gereinigt und zwar zunächst über die Interaktion des N-terminal an Tec1 fusionierten MBP-Proteins mit Amylose-Resin und anschließend über die C-terminal angefügten Histidinreste, die mit Nickel-Resin interagieren. Für den Interaktionstest wurde 1 µg gereinigtes MBP-Tec1 mit Amylose-Resin inkubiert, anschließend das ungebundene Protein gewaschen und dann 1 µg gereinigtes GST-Importin zugegeben. Nach 1-stündiger Inkubation wurde der Überstand in ein neues Reaktionsgefäß überführt, die darin enthaltenen Proteine gefällt und in 50 µl SDS-Probenpuffer resuspendiert. Die Amylose-Resin wurde dreimal gewaschen und anschließend in 60 µl SDS-Probenpuffer aufgenommen, um die daran gebundenen Proteine zu lösen. Jeweils 10 µl vom Überstand und von der an die Amylose gebundenen Fraktion („Pulldown“) wurden auf einem SDS-Polyacrylamidgel aufgetrennt und anschließend die Proteine durch eine Silberfärbung sichtbar gemacht.

Die Interaktion von MBP-Tec1 mit den Fusionsproteinen GST-Mtr10, GST-Kap104, GST-Pse1, GST-Kap95, GST-Srp1, GST-Kap123, GST-Nmd5, GST-Pdr6, GST-Sxm1, GST-Kap114 und GST-Kap120 wurde untersucht (Abb. 2.21).

Der Anteil an GST-Importin, der nicht an MBP-Tec1 gebunden hat, ist im Überstand zu finden, während in der Pulldown-Fraktion sowohl MBP-Tec1 als auch die GST-Importine, die damit interagiert haben, enthalten sind. Jede der Interaktionen wurde mehrfach getestet. Es konnte festgestellt werden, dass sieben von elf Importinen eine Interaktion mit Tec1 eingingen, nämlich Mtr10, Kap104, Pse1, Kap95, Srp1, Kap114 und Kap120. Keine Interaktion fand hingegen mit Kap123, Nmd5, Pdr6 und Sxm1 statt. Die stärkste Interaktion war bei Kap104 zu beobachten. Dieses Protein interagierte jedoch als einziges auch leicht mit der Amylose-Resin, wie in dem Kontrollversuch festzustellen war (Abb. 2.24C). Daher ist die Interaktion von Kap104 mit MBP-Tec1 vermutlich etwas schwächer als in Abb. 2.21 zu sehen ist. Kap114 und Kap120 interagierten auch verhältnismäßig stark mit MBP-Tec1, während die anderen Interaktionen eher schwach waren.

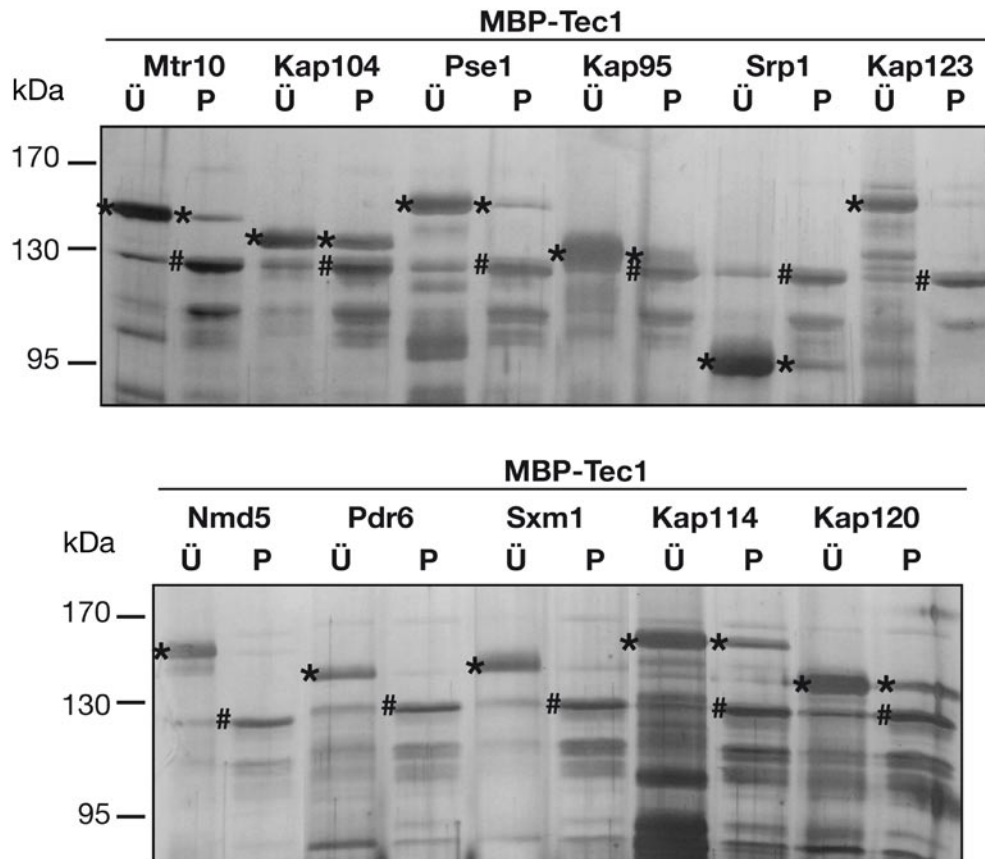


Abb. 2.21: *In vitro*-Interaktionstest von MBP-Tec1 mit GST-markierten Importinen. Gereinigtes MBP-Tec1 Protein wurde an Amylose-Resin immobilisiert und mit GST-Mtr10, GST-Kap104, GST-Pse1, GST-Kap95, GST-Srp1, GST-Kap123, GST-Nmd5, GST-Pdr6, GST-Sxm1, GST-Kap114 bzw. GST-Kap120 inkubiert. Ungebundene Proteine sind im Überstand (Ü) zu finden, MBP-Tec1 und daran gebundenes GST-Importin in der Pulldown-Probe (P). Die Proteine wurden in einem SDS-Polyacrylamidgel aufgetrennt und durch Silberfärbung sichtbar gemacht. * kennzeichnet die jeweiligen GST-Importine, # kennzeichnet MBP-Tec1. Die Negativkontrollen sind in Abb. 2.22 zu finden.

Alle für diese Experimente durchgeführten Negativkontrollen, bis auf die oben genannte Ausnahme (Interaktion von GST-Kap104 mit Amylose Resin), waren wie erwartet: Freies GST interagiert nicht mit MBP-Tec1 (Abb. 2.22A), freies MBP zeigte keine Wechselwirkung mit den GST-Importinen (Abb. 2.22B) und GST-Mtr10, GST-Pse1, GST-Kap95, GST-Srp1, GST-Kap114 und GST-Kap120 konnten nicht an die Amylose Resin binden (Abb. 2.22C).

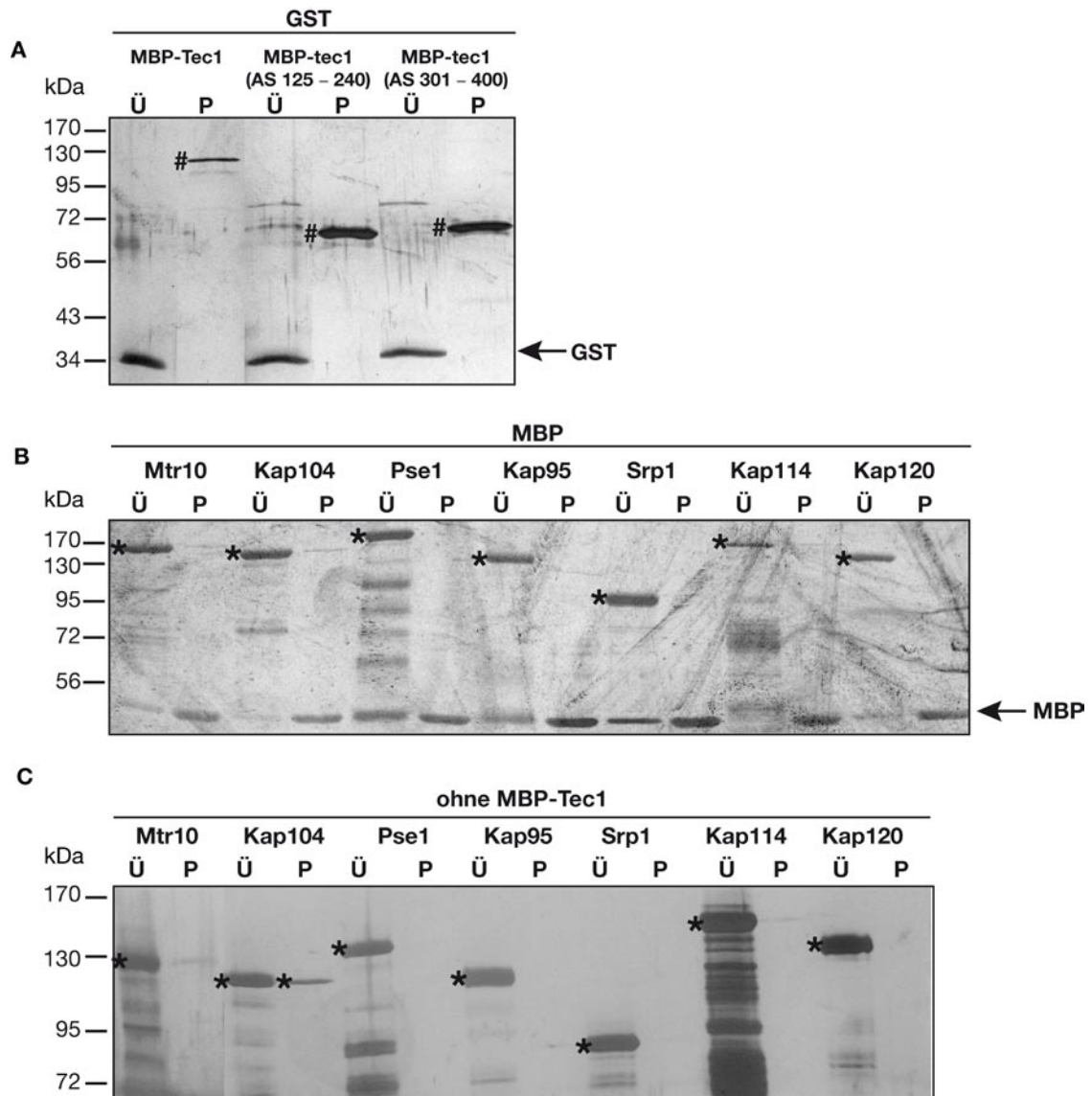


Abb. 2.22: Kontrollversuche zu den in Abb. 2.21 und Abb. 2.23 gezeigten Interaktionstests. A) Interaktionstest von freiem GST mit MBP-Tec1, MBP-Tec1^{AS 125-240} bzw. MBP-Tec1^{AS 301-400}. # kennzeichnet die MBP-Proteine. B) Interaktionstest von freiem MBP mit den GST-Importinen GST-Mtr10, GST-Kap104, GST-Pse1, GST-Kap95, GST-Srp1, GST-Kap114 und GST-Kap120. * kennzeichnet die GST-Proteine. C) Interaktionstest der GST-Importine GST-Mtr10, GST-Pse1, GST-Kap95, GST-Srp1, GST-Kap114 und GST-Kap120 mit Amylose-Resin. Nur bei GST-Kap104 konnte eine leichte Interaktion festgestellt werden. * kennzeichnet die GST-Proteine.

Ungebundene Proteine sind jeweils im Überstand (Ü) zu finden, an die Amylose Resin (direkt oder indirekt) gebundene Proteine in der Pulldown-Probe (P). Die Proteine wurden in einem SDS-Polyacrylamidgel aufgetrennt und durch Silberfärbung sichtbar gemacht.

Die Punktmutation R319A ist kritisch für die Funktion der NLS2 (Abb. 2.13). Daher wurde die Auswirkung dieses Austauschs auf die Interaktion mit einer Auswahl an Importinen, nämlich Mtr10, Kap104 und Pse1, getestet. Hierzu wurde die genannte Punktmutation in das Konstrukt *MBP-TEC1-His₆* eingeführt. Das Plasmid BHUM 1669 (MBP-Tec1^{R319A}-His₆) wurde während der von mir betreuten Masterarbeit von Kathrin

Wittkowski hergestellt und aus *E. coli* gereinigt (Wittkowski, 2009). Für das von mir durchgeführte Experiment wurde MBP-Tec1 bzw. MBP-Tec1^{R319A} wie oben beschrieben mit Amylose Resin inkubiert und anschließend GST-Mtr10, GST-Kap104 bzw. GST-Pse1 hinzugegeben. Alle drei getesteten Importine interagierten sowohl mit MBP-Tec1 als auch mit MBP-Tec1^{R319A} (Abb. 2.23). Die Interaktion des mutierten Proteins mit Kap104 und Pse1 war etwas schwächer, als mit dem wildtypischen Protein, jedoch war die Interaktion immer noch möglich. Die Aminosäure R319 ist diesen Ergebnissen zufolge nicht kritisch für die Interaktion mit Mtr10, Kap104 und Pse1.

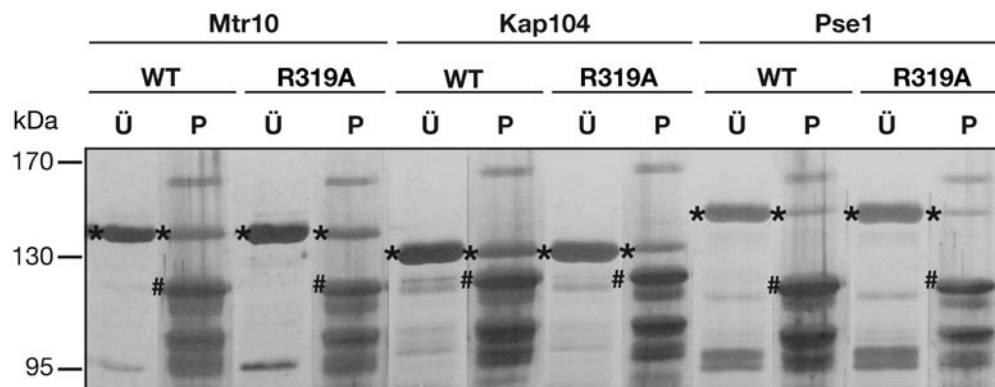


Abb. 2.23: *In vitro*-Interaktionstest von MBP-Tec1 und MBP-Tec1^{R319A} mit GST-Mtr10, GST-Kap104 und GST-Pse1. Gereinigtes MBP-Tec1 (WT) bzw. MBP-Tec1^{R319A} (R319A) Protein wurde an Amylose-Resin immobilisiert und mit GST-Mtr10, GST-Kap104 bzw. GST-Pse1 inkubiert. Ungebundenes Protein ist im Überstand (Ü) zu finden, MBP-Tec1 bzw. MBP-Tec1^{R319A} und daran gebundenes GST-Importin in der Pulldown-Probe (P). Die Proteine wurden in einem SDS-Polyacrylamidgel aufgetrennt und durch Silberfärbung sichtbar gemacht. * kennzeichnet die jeweiligen GST-Importine, # kennzeichnet MBP-Tec1 bzw. MBP-Tec1^{R319A}.

2.2.3 Die beiden NLSs von Tec1 unterscheiden sich in ihren Importin-Interaktionspartnern

Als nächstes wurde untersucht, welche der Importine mit der NLS1 bzw. NLS2 von Tec1 interagieren. Dazu wurden die NLS-enthaltenden Bereiche von *TEC1* in den Expressionsvektor pETM40 kloniert, der die „Tags“ MBP und His₆ enthält. Diese Fusionsproteine, MBP-Tec1^{AS 125–240}-His₆ (BHUM 1925) und MBP-Tec1^{AS 301–400}-His₆ (BHUM 1730), wurden in *E. coli* hergestellt und über Affinitätschromatographie gereinigt (zunächst über den MBP-Tag, dann über His₆). Mit den so erhaltenen Proteinen wurde der bereits für MBP-Tec1 beschriebene *in vitro*-Interaktionstest durchgeführt. Getestet wurden die sieben Importine, welche mit dem gesamten Tec1-Protein interagieren, also Mtr10, Kap104, Pse1, Kap95, Srp1, Kap114 und Kap120. Für

MBP-Tec1^{AS 125–240}-His₆ konnte mit den Importinen Mtr10, Kap104, Srp1 und Kap114 eine Interaktion nachgewiesen werden, wobei Srp1 und Kap114 stärker mit dem Tec1-Fragment interagierten als Mtr10 und Kap104 (Abb. 2.24A). Das NLS2-enhaltende Protein MBP-Tec1^{AS 301–400}-His₆ hingegen zeigte mit 6 von 7 Importinen eine Interaktion, nämlich mit Kap104, Pse1, Kap95, Srp1, Kap114 und Kap120. Mit Mtr10 interagiert es nicht. Die beobachteten Interaktionen waren alle relativ schwach und man kann keine deutlichen Unterschiede feststellen (Abb. 2.24B). Als Kontrolle wurde für dieses Experiment überprüft, ob MBP-Tec1^{AS 125–240}-His₆ und MBP-Tec1^{AS 301–400}-His₆ mit freiem GST interagieren. Dies war nicht der Fall (Abb. 2.22A)

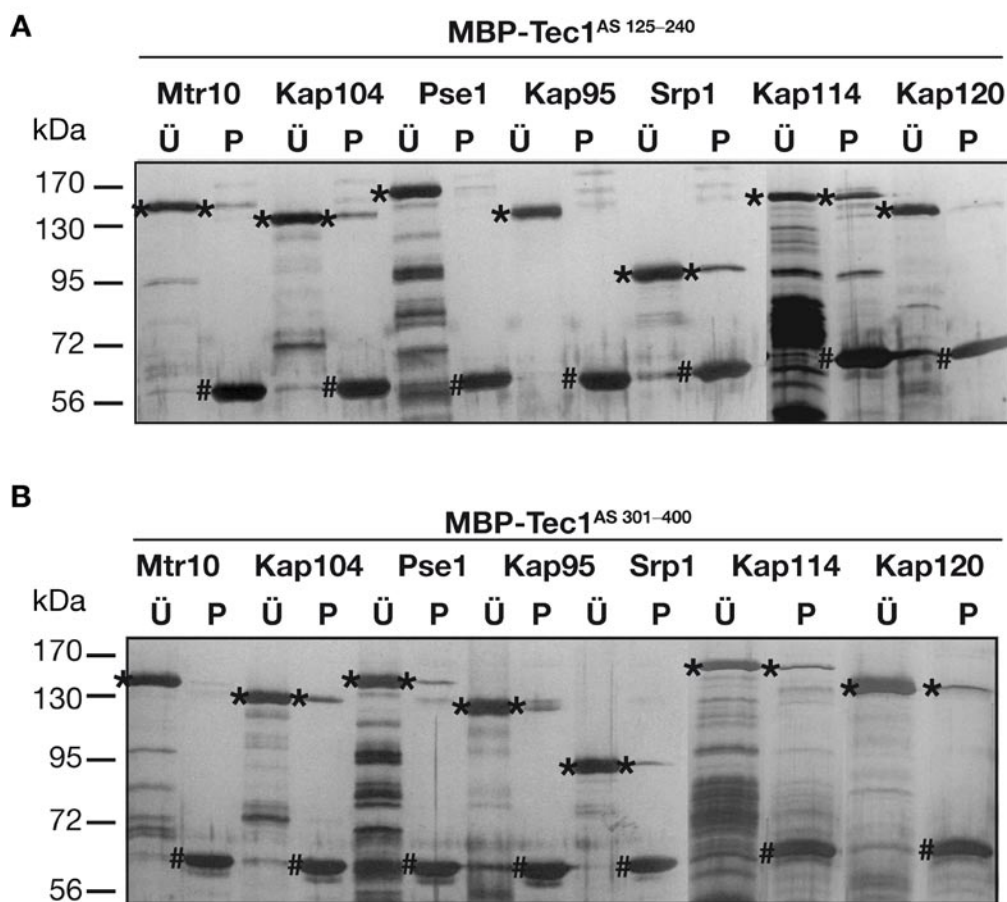


Abb. 24: *In vitro*-Interaktionstest von MBP-Tec1^{AS 125–240} bzw. MBP-Tec1^{AS 301–400} mit GST-Importinen. Die gereinigten Fusionsproteine MBP-Tec1^{AS 125–240} (A) bzw. MBP-Tec1^{AS 301–400} (B) wurden an Amylose-Resin immobilisiert und mit GST-Mtr10, GST-Kap104, GST-Pse1, GST-Kap95, GST-Srp1, GST-Kap114 bzw. GST-Kap120 inkubiert. Ungebundene Proteine sind im Überstand (Ü) zu finden, MBP-Tec1^{AS 125–240} bzw. MBP-Tec1^{AS 301–400} und daran gebundenes GST-Importin in der Pulldown-Probe (P). Die Proteine wurden in einem SDS-Polyacrylamidgel aufgetrennt und durch Silberfärbung sichtbar gemacht. * kennzeichnet die jeweiligen GST-Importine, # kennzeichnet MBP-Tec1^{AS 125–240} bzw. MBP-Tec1^{AS 301–400}. Die Negativkontrollen sind in Abb. 2.22 zu finden.

Zusätzlich wurde das Importin Pdr6, welches nicht mit MBP-Tec1 interagiert (Abb. 2.21) auch auf Interaktion mit den Proteinen MBP-Tec1^{AS 125–240} und MBP-Tec1^{AS 301–400} überprüft. Wie erwartet konnte Pdr6 auch an die NLS-enhaltenden Fragmente von Tec1 nicht binden (Daten nicht gezeigt).

Zusammenfassend ergab diese Interaktionsstudie, dass mehrere Importine eine in etwa gleich starke Interaktion mit Tec1 eingehen (Mtr10, Kap104, Pse1, Kap95, Srp1, Kap114 und Kap120). Vier dieser Importine interagieren mit der NLS1 von Tec1 (Mtr10, Kap104, Srp1 und Kap114) und sechs mit der NLS2 (Kap104, Pse1, Kap95, Srp1, Kap114 und Kap120). Generell scheint die Interaktion der Importine mit den einzelnen NLS-Fragmenten schwächer zu sein, als mit dem Gesamtprotein.

2.2.4 Die Interaktion von MBP-Tec1 mit dem Importin Pse1 wird durch Zugabe von RanGTP verhindert

Die Interaktion eines Importins mit seinem Cargo wird im Zellkern gelöst, da dort eine hohe Konzentration an RanGTP vorliegt. Dieses bindet an das Importin und löst eine Konformationsänderung aus, die dazu führt, dass das Cargo-Protein freigesetzt wird (Rexach & Blobel, 1995; Chook & Blobel, 1999). Wenn die in dieser Arbeit gezeigten Interaktionen zwischen Tec1 und den Importinen Mtr10, Kap104, Pse1, Kap95, Srp1, Kap114 und Kap120 spezifisch sind, sollte die Bindung daher durch Zugabe von Gsp1GTP (das RanGTP aus *S. cerevisiae*) gelöst bzw. verhindert werden. Dieses Experiment wurde bisher nur mit dem Protein Pse1 durchgeführt. Hierzu wurden 12 µg gereinigtes GST-Pse1 mit Glutathion-Sepharose inkubiert und somit daran gebunden. Nach einem Waschschrift wurden 3 µg gereinigtes MBP-Tec1-Protein hinzugegeben und nach einer Inkubationszeit von 1 Stunde wurde das ungebundene Protein von der Sepharose herunter gewaschen. In einem dritten Schritt wurden zu einem Ansatz 26 µg gereinigtes und mit GTP beladenes Gsp1^{Q71L} hinzugegeben, zu dem anderen Ansatz nur der für die GTP-Beladung verwendete Puffer. In dem Protein Gsp1 wurde die Aminosäure Glutamin an Position 71 gegen Leucin ausgetauscht, da dies die GTPase-Aktivität deutlich verringert (Frech *et al.*, 1994; Klebe *et al.*, 1995; Maurer *et al.*, 2001). Nach 1-stündiger Inkubation wurden die Kügelchen wieder gewaschen und mit 50 µl SDS-Probenpuffer versetzt. Die Proben wurden auf einem SDS-Polyacrylamidgel aufgetrennt und ein Immunoblot mit Antikörpern gegen MBP bzw. GST durchgeführt (Abb. 2.25). Das ca. 150 kDa große GST-Pse1 war in beiden Ansätzen in etwa gleicher

Menge vorhanden. In dem Ansatz ohne Gsp1GTP ist im Immunoblot eine deutliche Bande bei 100 kDa zu erkennen, die MBP-Tec1 entspricht. Es konnte also auch durch diese Methode die Interaktion von MBP-Tec1 mit GST-Pse1 bestätigt werden. In dem Ansatz, dem Gsp1GTP hinzugefügt wurde, war die Bande von MBP-Tec1 nicht mehr zu detektieren. Dies zeigt, dass die Interaktion dieser beiden Proteine spezifisch ist, da sie durch Zugabe von RanGTP gelöst werden konnte.

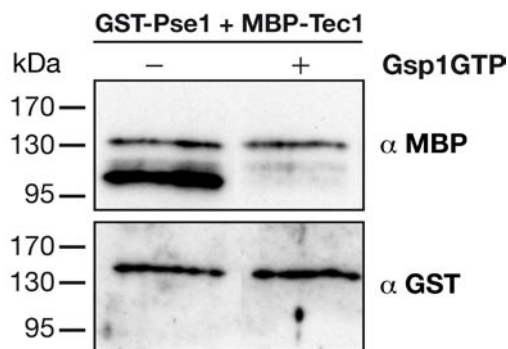


Abb. 2.25: *In vitro*-Interaktionstest von MBP-Tec1 mit GST-Pse1 ohne (–) und mit (+) Zugabe von Gsp1^{Q71L}GTP. Gereinigtes GST-Pse1-Protein wurde an GSH-Sepharose immobilisiert und mit gereinigtem MBP-Tec1 inkubiert. Anschließend folgte eine Inkubation mit Gsp1^{Q71L}GTP bzw. als Kontrolle der zur Beladung von Gsp1 verwendete Puffer. Die (direkt oder indirekt) an die Sepharose gebundenen Proteine wurden durch Zugabe von SDS-Probenpuffer von der Sepharose gelöst und in einem SDS-Polyacrylamidgel aufgetrennt. Gezeigt sind Immunoblots mit Antikörpern gegen MBP bzw. GST. MBP-Tec1 hat eine Größe von ca. 100 kDa, GST-Pse1 ist ca. 150 kDa groß.

2.2.5 MBP-Tec1 zeigt keine Interaktion mit dem Transportin Msn5, bzw. den Exportinen Cse1 und Crm1 in Gegenwart von Gsp1GTP

In *S. cerevisiae* sind vier Karyopherine für den Export aus dem Zellkern zuständig, drei Exportine (Cse1, Crm1 und Los1) sowie das Transportin Msn5. Für drei dieser Transportmoleküle (Msn5, Cse1 und Crm1) wurde die Interaktion mit MBP-Tec1 überprüft. Exportine binden im Allgemeinen ihr Cargo nur in Anwesenheit von Gsp1GTP, welches im Zellkern in hoher Konzentration vorliegt. Daher wurde die Interaktion sowohl in An- als auch in Abwesenheit von Gsp1GTP getestet. Dazu wurde die gleiche Methode angewandt, wie für die Importine (Abschnitt 2.2.2), außer dass bei dem Inkubationsschritt mit den Karyopherinen zusätzlich gereinigtes und mit GTP beladenes Gsp1^{Q71L}, bzw. als Kontrolle nur der für die Beladung mit GTP verwendete Puffer, hinzugefügt wurde.

In Abwesenheit von Gsp1^{Q71L}GTP ist keine Interaktion der Exportproteine mit MBP-Tec1 zu erwarten und dies war auch der Fall (Abb. 2.26). Jedoch war auch in Anwesenheit von Gsp1^{Q71L}GTP keine Interaktion von Msn5, Cse1 und Crm1 mit MBP-

Tec1 zu beobachten (Abb. 2.26). Auf der Höhe, wo das Protein Msn5 im silbergefärbten SDS-Polyacrylamidgel im Überstand zu sehen ist, sieht man auch in den Pulldown-Proben eine schwache Bande. Diese ist allerdings mit hoher Wahrscheinlichkeit unspezifisch, da diese Banden auch in den Pulldown-Spuren der Proteine Cse1 und Crm1 zu sehen sind. Dementsprechend konnte in dieser Arbeit keine Interaktion von Msn5, Cse1 und Crm1 mit MBP-Tec1 nachgewiesen werden. Das Exportin Los1 wurde nicht untersucht.

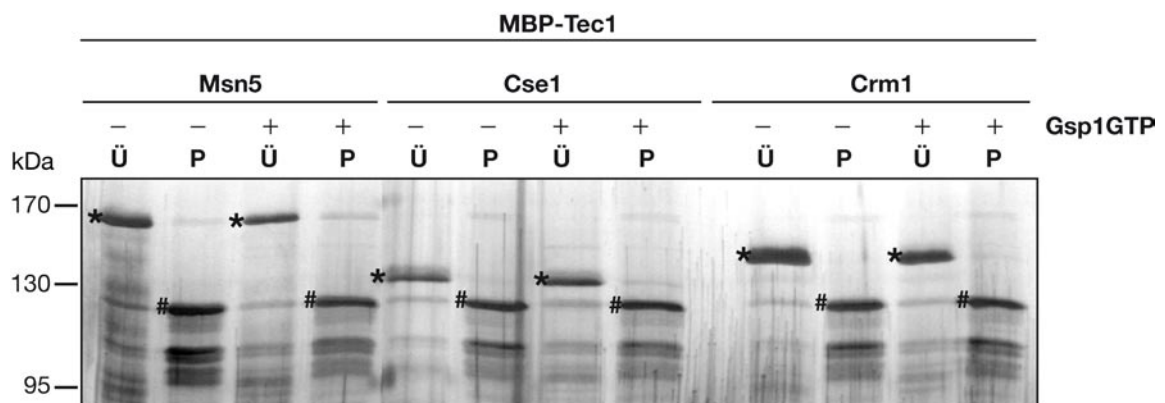


Abb. 2.26: *In vitro*-Interaktionstest von MBP-Tec1 mit den Karyopherinen GST-Msn5, GST-Cse1 und GST-Xpo1. Gereinigtes MBP-Tec1 Protein wurde an Amylose-Resin immobilisiert und mit GST-Msn5, GST-Cse1 bzw. GST-Crm1 inkubiert. Zusätzlich wurde Gsp1^{Q71L}GTP (+) bzw. nur der für die Beladung von Gsp1 verwendete Puffer (-) zugegeben. Ungebundene Proteine sind im Überstand (Ü) zu finden, MBP-Tec1 und daran gebundenes GST-Proteine in der Pulldown-Probe (P). Die Proteine wurden in einem SDS-Polyacrylamidgel aufgetrennt und durch Silberfärbung sichtbar gemacht. * kennzeichnet die jeweiligen GST-Proteine, # kennzeichnet MBP-Tec1.

2.3 GFP-Tec1 lokalisiert teilweise in perinukleären Foci, deren Art und Funktion unklar bleibt

Im Laufe der vorliegenden Arbeit wurden bei verschiedenen GFP-Tec1-Konstrukten punktuelle Lokalisierungen im Fluoreszenzmikroskop beobachtet. In Abschnitt 2.1.2 wurde für die Fusion der TEA-Domäne an GFP (GFP-Tec1^{AS 125-199}) bereits beschrieben, dass dieses Fusionsprotein ausschließlich an einer kleinen Stelle in der Zelle lokalisierte (Abb. 2.3, Abb. 2.27A). Dies war bei allen Zellen, die dieses GFP-markierte Protein exprimieren, zu beobachten.

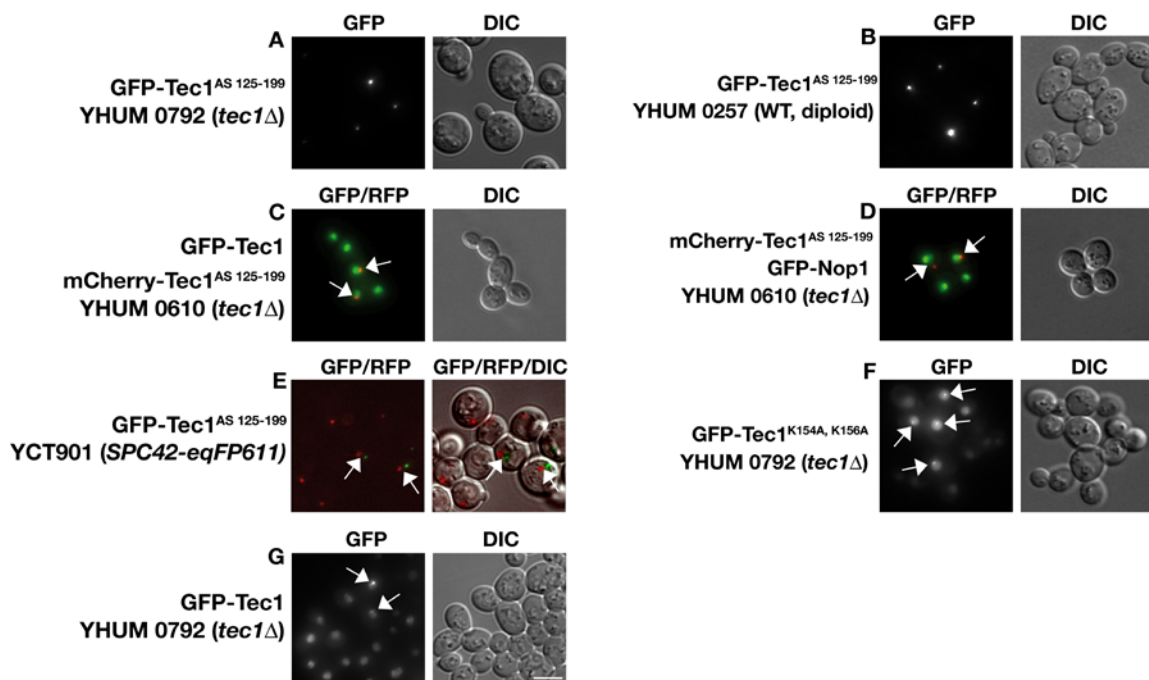


Abb. 2.27: Fokale Lokalisierung von Tec1^{AS 125-199} bzw. Tec1-Mutanten. Fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen der GFP-Signale nach Anregung bei 395 nm (GFP), der RFP-Signale nach Anregung bei 555 nm (RFP) und die zugehörigen Durchlichtbilder (DIC). Der Maßstab entspricht 5 μ m. A) GFP-Tec1^{AS 125-199} (BHUM 1217) in YHUM 0792 (*tec1* Δ), B) GFP-Tec1^{AS 125-199} (BHUM 1217) in YHUM 0257 (Wildtyp, diploid), C) GFP-Tec1 (BHUM 1196) (grün) und mCherry-Tec1^{AS 125-199} (BHUM 1488) (rot) in YHUM 0610 (*tec1* Δ), D) mCherry-Tec1^{AS 125-199} (BHUM 1488) (rot) und GFP-Nop1 (BHUM 1497) (grün) in YHUM 0610 (*tec1* Δ), E) GFP-Tec1^{AS 125-199} (BHUM 1217) (grün) in YCT 901 (*SPC42-eqFP611*, diploid) (rot), F) GFP-Tec1^{K154A, K156A} (BHUM 1383) in YHUM 0792 (*tec1* Δ), G) GFP-Tec1 (BHUM 1196) in YHUM 0792 (*tec1* Δ).

Da die Proteinmenge dieses Tec1-Fragments mit der von GFP-Tec1^{AS 1-240} (BHUM 1197) vergleichbar ist (Abb. 2.5 und Daten nicht gezeigt), leuchtete dieser Punkt in der Zelle sehr hell, denn eine große Menge Protein lokalisierte auf kleinstem Raum. Da diese punktuelle Lokalisierung bei dem Konstrukt auftrat, bei dem nur die DNA-Bindedomäne von Tec1 an GFP fusioniert ist, könnte die Ursache eine starke Bindung

an TCS-Elemente im Genom sein. Es ist denkbar, dass sich die Gene, die (unter anderem) durch Tec1 aktiviert werden, in räumlicher Nähe zueinander befinden, woraus dann die punktuelle Lokalisierung von GFP-Tec1^{AS 125–199} (BHUM 1217) resultieren könnte. In diploiden Zellen, bei denen ein doppelter Chromosomensatz vorliegt, könnte man dieser Theorie zufolge erwarten, dass das Fusionsprotein an zwei Stellen im Genom lokalisiert und daher zwei punktförmige Fluoreszenzsignale zu beobachten sind. Diese Hypothese wurde getestet, indem GFP-Tec1^{AS 125–199} (BHUM 1217) in einem diploiden Hefestamm (YHUM 0257) hergestellt wurde. Es konnte jedoch auch hier nur ein fluoreszierender Punkt pro Zelle detektiert werden (Abb. 2.27B). Als nächstes wurde untersucht, ob die Signale von wildtypischem GFP-Tec1 (BHUM 1196) und von dem punktuell lokalisierten Tec1-Fragment partiell kolokalisieren. Dazu wurde die TEA-Domäne (AS 125–199) an das rot fluoreszierende Protein mCherry fusioniert (BHUM 1488). Beide Plasmide (BHUM 1196 und BHUM 1488) wurden gleichzeitig in dem Hefestamm YHUM 0610 (*tec1Δ*) exprimiert. Dabei ließ sich beobachten, dass die punktförmige Lokalisierung von mCherry-Tec1^{AS 125–199} in den meisten Fällen direkt neben dem GFP-Tec1-Signal auftrat (Abb. 2.27C). Bei 59 von 74, also 91 %, der gezählten Zellen war dies der Fall. In 11 % der Zellen war das punktuelle Signal nicht direkt an der Peripherie des Kerns, sondern etwas weiter davon entfernt und in nur 1 % der Zellen war eine deutliche Kolokalisierung zu beobachten.

Der Nukleolus von Hefezellen hat eine sichelähnliche Form und liegt meistens an der Peripherie der Zellkerne (Yang *et al.*, 1989; Warner, 1990). Daher wurde überprüft, ob das Fusionsprotein mCherry-Tec1^{AS 125–199} (BHUM 1488) mit dem im Nukleolus lokalisierten Protein Nop1 kolokalisiert. Dazu wurde das Plasmid BHUM 1497 (GFP-Nop1) zusammen mit BHUM 1488 in den Hefestamm YHUM 0610 (*tec1Δ*) eingebracht. Nur in 5 % der Zellen war eine partielle Überlappung der beiden Signale zu beobachten, während in 37 von 39 Zellen, also 95 %, keine Kolokalisierung vorlag (Abb. 2.27D).

Schließlich wurde auch getestet, ob GFP-Tec1^{AS 125–199} mit dem Protein Spc42, das Bestandteil des Spindelpolkörpers ist, kolokalisiert. Hierzu wurde das Plasmid BHUM 1217 (GFP-Tec1^{AS 125–199}) in den Hefestamm YCT 901 eingebracht, in welchem das Protein Spc42 mit einem rot fluoreszierenden Protein fusioniert ist. Nur in sehr wenigen Zellen konnten beide Fluoreszenzsignale detektiert werden, da das GFP-fusionierte Tec1^{AS 125–199} in diesem Stamm vermutlich nur schwach exprimiert wurde. Daher wurde keine statistische Auswertung der Kolokalisierung vorgenommen. Jedoch waren in allen

Zellen, in denen beide Fusionsproteine im Fluoreszenzmikroskop sichtbar waren, die Signale deutlich voneinander entfernt (Abb. 2.78E).

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass sowohl in haploiden, als auch in diploiden Hefezellen das Tec1^{AS 125–199}-Fragment in einem Punkt in der Zelle lokalisiert, welcher an der Peripherie des Zellkerns zu finden ist. Des Weiteren konnten der Nukleolus, sowie der Spindelpolkörper als Ort für die punktuelle Lokalisierung ausgeschlossen werden, da weder eine Kolo­kalisierung mit Nop1, noch mit Spc42 festzustellen war. Somit bleibt die genaue Stelle in der Zelle, an der diese spezielle Lokalisierung stattfindet, weiter unklar.

Wie bereits in Abschnitt 2.1.6 für die Punktmutanten GFP-Tec1^{K149A} und GFP-Tec1^{R164A} (Abb. 2.14) beschrieben, war ein ähnliches Lokalisierungsmuster auch für das Gesamtprotein, in dem einzelne Aminosäuren mutiert sind, zu beobachten. Dies war auch bei GFP-Tec1^{K154A, K156A} der Fall (Abb. 2.27F). Bei den erwähnten Punktmutanten war eine Kernlokalisierung zu beobachten, jedoch in ca. 40 % der Zellen war zusätzlich an der Peripherie des Zellkerns eine stärker fluoreszierende punktuelle Lokalisierung zu sehen. Interessanterweise war in seltenen Fällen auch beim Wildtyp-GFP-Tec1 eine solche Lokalisierung zu beobachten (Abb. 2.27 G). Zu diesen Beobachtungen sind in der vorliegenden Arbeit keine weiteren Untersuchungen durchgeführt worden. Es besteht jedoch die Vermutung, dass es sich bei den in der punktuellen Region lokalisierten Proteinen um eine Aggregation fehlgefalteter Proteine handeln könnte.

3. Diskussion

3.1 Die Sekundärstruktur der „novel NLS“ ist vermutlich für die Funktion wichtig

In der C-terminalen Hälfte von Tec1 wurde durch Sequenzvergleich mit bekannten Kernlokalisierungssignalen eine putative NLS identifiziert. Die Aminosäuren 344–373 von Tec1 stimmen weitgehend mit der Konsensussequenz der so genannten „novel NLS“ (Fries *et al.*, 2007) überein. Diese wurde in dem Protein Asr1 aus *S. cerevisiae* identifiziert und ist sowohl zwischen den homologen Proteinen verschiedener Pilze konserviert, als auch in dem Histon H2A zu finden. Des Weiteren wurde eine Strukturvorhersage für den Bereich der NLS durchgeführt die ergab, dass es sich vermutlich um zwei kurze helikale Bereiche handelt, die durch eine Linker-Region getrennt sind (Fries *et al.*, 2007). Für den Bereich der Aminosäuren 344–373 von Tec1 ergab die Strukturvorhersage, dass die Sekundärstruktur aus einer α -Helix besteht (www.predictprotein.org) (Rost *et al.*, 2004). Sowohl in Asr1 als auch in Tec1 befindet sich diese (putative) NLS in der C-terminalen Hälfte des Proteins und nicht im Bereich der DNA-Bindedomäne.

Eine 38 Aminosäuren lange Sequenz des Proteins Asr1, welche die NLS-Sequenz plus 5 bzw. 6 flankierende Aminosäuren vor bzw. hinter dem Bereich enthält, ist notwendig und hinreichend für Kernlokalisierung (Fries *et al.*, 2007). Die entsprechende Sequenz aus Tec1 ist hingegen nicht hinreichend für die Kernlokalisierung. Selbst ein Fragment, das insgesamt 40 zusätzliche flankierende Aminosäuren enthält (GFP-Tec1^{AS 333–412}), vermittelt keine Kernlokalisierung. Daher ist es sehr unwahrscheinlich, dass die Faltung des Fragments nicht korrekt ist. Weiterhin konnte in der vorliegenden Arbeit gezeigt werden, dass auch in den Hefestämmen S288c und W303 kein Kernimport des Tec1-Fragments erfolgt. Demnach unterscheidet sich der Stamm Σ 1278b diesbezüglich nicht von den anderen beiden Stämmen. Schließlich wurde auch gezeigt, dass der Austausch der Aminosäure Histidin 373 gegen Arginin die Funktionalität der putativen NLS nicht ermöglichen kann, obwohl durch diesen Austausch die Sequenz von Tec1 genau einer Variante der Konsensussequenz entspricht (Fries *et al.*, 2007). Daraus lässt sich folgern, dass die veröffentlichte Konsensussequenz der „novel NLS“ in dieser Form nicht allgemeingültig ist, sondern noch andere Parameter für die Funktionalität entscheidend sind. Einer dieser Faktoren könnte die Länge und/oder Sequenz der Linkerregion sein,

die von Fries *et al.* (2007) als variabel angegeben wurde. In Asr1 aus *S. cerevisiae* und dem homologen Protein aus *Candida glabrata* ist die mittlere Region der NLS 13 Aminosäuren lang, in dem Homolog aus *Candida albicans* 24 Aminosäuren. In H2A aus *S. cerevisiae* und allen untersuchten homologen Proteinen sind jeweils nur drei Aminosäuren zwischen den beiden Teilen der NLS zu finden (Fries *et al.*, 2007). In Tec1 hingegen sind es 16 Aminosäuren, die zwischen den beiden Motiven der putativen NLS liegen. Der Abstand zwischen den beiden Teilen der NLS ist somit in verschiedenen Proteinen bzw. Organismen unterschiedlich. Dennoch könnte er kritisch für die Interaktion mit den Importinen sein, da die beiden Motive möglicherweise durch den Linker in eine bestimmte räumliche Nähe gebracht werden. Eine weitere Ursache, warum die putative NLS in Tec1 nicht funktionell ist, könnte die Sequenz der Linkerregion sein. In Asr1 enthält diese viele Prolin- und Leucinreste. Die „helixbrechende“ Eigenschaft von Prolinresten erklärt auch die Helix-Linker-Helix Sekundärstruktur der NLS in Asr1. In dem entsprechenden Bereich von Tec1 sind keine Prolin- bzw. Leucinreste zu finden und die Sekundärstruktur ist wahrscheinlich eine durchgehende Helix. Die unterschiedliche Sekundärstruktur ist vermutlich der ausschlaggebende Grund, warum die putative NLS in Tec1 nicht funktionell ist.

Interessanterweise haben weder die klassischen NLSs, noch die M9-ähnlichen NLSs, noch die IBB-Domäne von Importin α eine Sekundärstruktur (Conti & Kuriyan, 2000; Lee *et al.*, 2006; Madrid & Weis, 2006). Die bisher veröffentlichten Konsensussequenzen von NLSs beziehen sich demnach nur auf die Primärstruktur. Durch die Analyse dieser putativen NLS in Tec1 konnte somit die Vermutung der Autoren Fries *et al.* (2007) bestätigt werden, dass es sich bei der novel NLS um ein neuartiges Lokalisierungssignal handelt, bei dem die Sekundärstruktur eine Rolle spielt. Die veröffentlichte Konsensussequenz müsste demnach insofern erweitert werden, dass die Linkerregion nicht eine beliebige Aminosäuresequenz sein darf, sondern helixbrechende Reste wie Prolin enthalten muss, um eine Helix-Linker-Helix Struktur zu ermöglichen.

3.2 Der Transkriptionsfaktor Tec1 enthält zwei funktionelle Kernlokalisierungssignale

3.2.1 NLS1 und NLS2 von Tec1 sind unterschiedlich effizient

Die experimentelle Analyse des Tec1-Proteins zur Identifizierung des Kernlokalisierungssignals ergab, dass sowohl die N-terminale als auch die C-terminale Hälfte von Tec1 im Kern lokalisieren. Dies bedeutet, dass es mindestens zwei Bereiche in Tec1 gibt, die Kernlokalisierung vermitteln. Die beiden putativen NLSs wurden auf die Bereiche der Aminosäuren 125–240 und 301–400 eingegrenzt. Die Domänenstruktur des Tec1-Proteins kann demnach um die NLS1 und die NLS2 erweitert werden (Abb. 3.1).

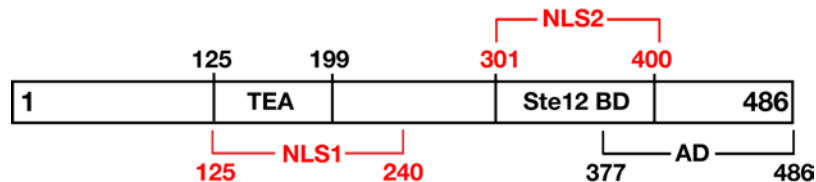


Abb. 3.1: Erweiterte Domänenstruktur von Tec1. Dem Tec1-Protein können den Ergebnissen dieser Arbeit zufolge zwei weitere funktionelle Bereiche zugeordnet werden: die Kernlokalisierungssignale NLS1 im Bereich der Aminosäuren 125–240 und NLS2 im Bereich der Aminosäuren 301–400. TEA = TEA-Domäne, Ste12 BD = Ste12-Bindedomäne, AD = Aktivierungsdomäne.

Es fällt auf, dass die beiden NLSs eine unterschiedlich starke Kernlokalisierung der Tec1-Fragmente vermitteln. Während die N-terminale Hälfte von Tec1 (GFP-Tec1^{AS 1–240}) eine Kern-Zytoplasma-Relation von 27 ± 8 zeigt, akkumuliert das Fusionsprotein mit der C-terminalen Hälfte (GFP-Tec1^{AS 241–486}) deutlich stärker im Kern (43 ± 10) (Abb. 2.3). Es besteht eine quantitative Beziehung zwischen der Affinität einer NLS zum Import-Rezeptor und der Kernakkumulation des Cargos im Gleichgewichtszustand (Hodel *et al.*, 2006). Demnach spiegelt die nukleozytoplasmatische Relation eines GFP-Fusionsproteins die „Stärke“ der darin enthaltenen NLS wider. Dies deutet darauf hin, dass die NLS2 von Tec1 eine höhere Effizienz als die NLS1 hat. Für den Glukokortikoidrezeptor wurde bereits beschrieben, dass der NL2-vermittelte Kernimport langsam und ineffizient ist im Vergleich zu dem NL1-vermittelten Import (Cadepond *et al.*, 1992). Vielleicht hatte das Protein Tec1 ursprünglich nur die NLS1 in der TEA-Domäne, die durch Ko-Evolution aus der DNA-Bindedomäne entstanden ist und eine eher schwache Kernlokalisierung vermittelt. Später könnte sich dann die zweite NLS entwickelt haben, um die Effizienz des Kerntransports zu verbessern.

Interessanterweise ist für beide NLS-enhaltende Fragmente zu beobachten, dass sich das Verhältnis der Fluoreszenz im Zellkern zu der im Zytoplasma bei den unterschiedlich langen Tec1-Bereichen verändert. Generell ist es so, dass die kürzeren NLS-enhaltenden Fragmente stärker im Kern akkumulieren, als die längeren. Die Proteine GFP-Tec1^{AS 110–270}, GFP-Tec1^{AS 110–240} und GFP-Tec1^{AS 125–240} akkumulieren stärker im Kern als GFP-Tec1^{AS 1–240}. Diese Diskrepanz könnte verschiedene Ursachen haben. Zum einen könnte es sein, dass die Fusionsproteine mit den kürzeren Tec1-Fragmenten schneller in den Zellkern transportiert werden können, weil sie kleiner sind. Bei einer Größe von ca. 50 kDa könnte theoretisch auch Diffusion in den Zellkern möglich sein, was zur Anreicherung im Zellkern beitragen könnte. Zum anderen besteht die Möglichkeit, dass sich in der N-terminalen Hälfte von Tec1 zwischen Aminosäure 1 und 110 eine Sequenz befindet, die den Kernimport negativ beeinflusst oder einen Kernexport bewirkt.

Auch für die C-terminalen Fragmente ist ein Unterschied in der Stärke der Kernlokalisierung festzustellen. Die NLS2-enhaltenden Fragmente GFP-Tec1^{AS 253–412} und GFP-Tec1^{AS 301–400} akkumulieren deutlich stärker im Kern als GFP-Tec1^{AS 241–486}. Als Erklärung kommen hier prinzipiell die gleichen Möglichkeiten wie für die NLS1-enhaltenden Fragmente in Betracht. Allerdings ist es eher unwahrscheinlich, dass es in Tec1 zwei Bereiche gibt, die den Kernimport stören bzw. Kernexport bewirken, zumal es bisher keine Hinweise dafür gibt, dass Tec1 unter bestimmten Bedingungen exportiert oder im Zytoplasma gehalten wird. Daher ist die unterschiedliche Effizienz der Kernanreicherung eher auf die Größe der einzelnen Fragmente zurückzuführen. Die kleineren Proteine können wahrscheinlich schneller transportiert werden, da sie das gelartige Maschenwerk der Nukleopore im inneren des Kernporenkomplexes schneller passieren können, als größere Moleküle.

Theoretisch wäre es auch denkbar, dass die Proteinmenge der einzelnen Fusionsproteine in der Zelle eine Rolle bei der nukleozytoplasmatischen Verteilung spielt. Für die NLS2-enhaltenden Fragmente kann dies jedoch ausgeschlossen werden: GFP-Tec1^{AS 241–486} ist fünfmal höher konzentriert als das wildtypische GFP-Tec1-Protein. Das kürzere Protein GFP-Tec1^{AS 301–400} hingegen ist mehr als doppelt so hoch konzentriert, nämlich 11-mal mehr als das Wildtypprotein, akkumuliert aber deutlich stärker im Zellkern als GFP-Tec1^{AS 241–486}. Demnach kann die Transportmaschinerie bei dem weniger stark im Kern akkumulierten Protein noch nicht gesättigt sein. Da GFP-Tec1^{AS 1–240} ca. 15-mal höher konzentriert ist als GFP-Tec1 und damit nicht sehr viel mehr

Protein in der Zelle ist, als von GFP-Tec1^{AS 301–400}, ist es auch für dieses Protein unwahrscheinlich, dass die nukleozytoplasmatische Verteilung von der Proteinmenge beeinflusst wird. Auch eine andere Studie ergab, dass keine Korrelation zwischen der nukleozytoplasmatischen Relation und der Anzahl der Moleküle von GFP-Fusionsproteinen besteht (Hodel *et al.*, 2006). Daher haben Variationen in den Expressionslevels der GFP-Fusionsproteine bzw. Unterschiede der posttranslationalen Regulation keinen starken Effekt auf die nukleozytoplasmatische Verteilung der Proteine.

3.2.2 Die NLS1 von Tec1 überlappt mit der TEA-Domäne

3.2.2.1 Die DNA-Bindedomäne könnte generell eine Rolle beim Kerntransport von TEAD-Transkriptionsfaktoren spielen.

Für die Transkriptionsfaktoren der TEAD-Familie wurde bisher keine detaillierte Studie zum Kernimport durchgeführt. In dem Protein Scalloped aus *Drosophila melanogaster* wurde eine Sequenz mit Ähnlichkeit zu der klassischen bipartiten NLS identifiziert, die sich auch in dem Protein TEAD-1 aus *Homo sapiens* findet (Srivastava *et al.*, 2002). Eine experimentelle Bestätigung, dass es sich bei diesem Motiv tatsächlich um eine funktionelle NLS handelt, steht jedoch aus. Auch in den TEAD-Proteinen anderer Organismen findet man Sequenzen, die der klassischen monopartiten bzw. bipartiten NLS ähnlich sind. Alle in Tabelle 2 aufgeführten Motive liegen in der N-terminalen Hälfte des jeweiligen Proteins. Darüber hinaus sind einige davon im Bereich der TEA-Domäne zu finden, nämlich die Motive aus TEAD-1 (*Homo sapiens*), Scalloped (*Drosophila melanogaster*) und eine der Sequenzen (AS 186–191) aus AbaA (*Aspergillus nidulans*). Die putative bipartite NLS aus Egl-44 (*Caenorhabditis elegans*) überlappt teilweise mit der TEA-Domäne. Für die TEA-Domäne des Proteins Scalloped (*Drosophila melanogaster*) konnte bereits gezeigt werden, dass sie hinreichend für die Kernlokalisierung ist (Srivastava *et al.*, 2002). In dieser Arbeit konnte der TEA-Domäne von *S. cerevisiae* Tec1 ebenfalls eine Rolle beim Kerntransport zugeordnet werden. Daher könnte es sich um eine allgemeine Eigenschaft der TEA-Domäne handeln, dass sie an der Vermittlung des Kernimports beteiligt ist. Da in der TEA-Domäne von Tec1 durch Sequenzvergleich keine bekannte NLS-Sequenz identifiziert werden konnte und sie dennoch eine Rolle beim Kerntransport spielt, ist es möglich,

dass auch die TEA-Domäne von dem Tec1-Protein des nah verwandten Pilzes *Candida albicans* in den Kerntransport involviert ist.

Für Proteine mit Homöodomänen wurde bereits die Hypothese aufgestellt, dass diese DNA-Bindedomänen generell eine Funktion bei der Kernlokalisierung spielen könnten (Hall *et al.*, 1990). In dem Protein Mat α 2 aus *S. cerevisiae* ist eine der beiden NLSs in der Homöodomäne zu finden und sie ähnelt Sequenzen in anderen Homöodomänenproteinen (Hall *et al.*, 1990).

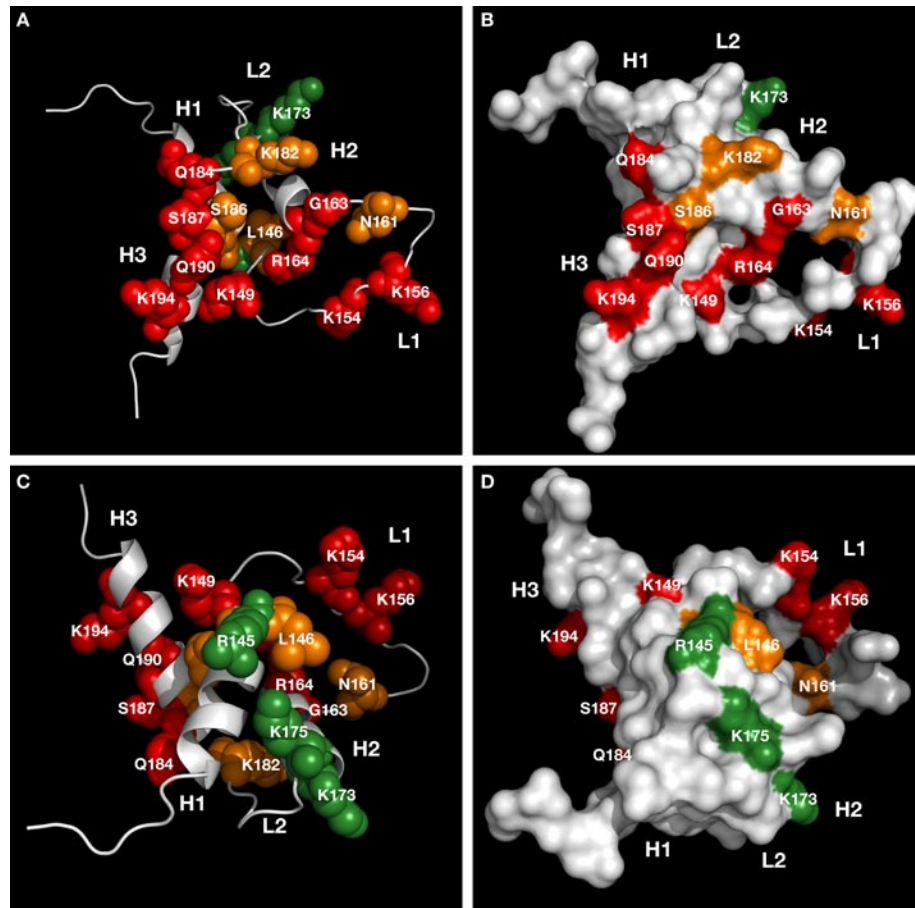
Dass NLS-Sequenzen häufig innerhalb einer DNA-Bindedomäne zu finden sind, ist seit längerem bekannt. In einer Studie wurden 736 kernlokalisierte Proteine verschiedener Organismen untersucht, bei denen sowohl die DNA-Bindedomäne als auch die NLS bekannt waren. Bei 90 % dieser Proteine überlappten die beiden funktionellen Bereiche (Cokol *et al.*, 2000). Diese Bifunktionalität ist sowohl bei verschiedenen Typen von DNA-Bindedomänen, als auch mit unterschiedlichen NLS-Motiven zu beobachten (LaCasse & Lefebvre, 1995). Aus evolutionärer und funktioneller Sicht macht die Überlappung von DNA-Bindedomäne und NLS Sinn. Alle Proteine mit DNA-Bindedomäne müssen prinzipiell in den Zellkern transportiert werden, um ihre Funktion erfüllen zu können. Außerdem sind sowohl DNA-Bindedomäne als auch NLS (häufig) basisch, da sie negativ geladene Interaktionspartner (DNA bzw. Karyopherine) haben. Daher ist es möglich, dass NLSs und DNA-Bindedomänen durch divergente Evolution entstanden sind, wobei sich der Theorie zufolge die beiden spezialisierten Bereiche aus einem ursprünglich gemeinsamen Motiv entwickelt haben (LaCasse & Lefebvre, 1995). Die räumliche Nähe der beiden funktionellen Bereiche suggeriert, dass dies einen evolutionären Vorteil für das Protein hat (LaCasse & Lefebvre, 1995). So könnte z. B. eine basische NLS die DNA-Bindung durch zusätzliche positiv geladene Aminosäuren verstärken (LaCasse & Lefebvre, 1995). Eine weitere Hypothese ist, dass die räumliche Nähe der beiden funktionellen Motive eine koordinierte Regulation ermöglicht, z. B. das gleichzeitige Maskieren der Region, um sowohl Kerntransport als auch DNA-Bindung zu verhindern (LaCasse & Lefebvre, 1995). Eine im Zytoplasma exponierte DNA-Bindedomäne könnte nämlich RNA binden oder durch posttranslationale Modifikationen verändert werden, was ihre Funktion später stören könnte (LaCasse & Lefebvre, 1995). DNA-Bindedomänen, wie auch NLSs müssen an der Oberfläche des Proteins exponiert sein, um ihre Interaktionspartner binden zu können. Daher ist es auch diesbezüglich sinnvoll, dass die Bereiche überlappen.

Importine können auch die Funktion von zytoplasmatischen Chaperonen erfüllen, indem sie eine Aggregation von Proteinen über deren basische Regionen, v. a. DNA- und RNA-Bindedomänen, verhindern (Jäkel & Görlich, 1998; Jäkel *et al.*, 1999). Dies ist ein wichtiger Grund, warum es für die Zelle sinnvoll ist, NLSs in DNA- oder RNA-Bindedomänen zu haben. Diese sehr basischen Regionen des Proteins neigen dazu in importinfreiem Zytoplasma mit Polyanionen, wie z. B. tRNA zu aggregieren, da sie multivalente ionische Interaktionen eingehen können (Jäkel *et al.*, 2002). Dadurch, dass im Zytoplasma das Importin an die in der DNA-Bindedomäne liegende NLS bindet, wird der Bereich verdeckt und kann nicht aggregieren.

3.2.2.2 Mehrere Aminosäuren sind kritisch für die NLS1-vermittelte Kernlokalisierung

Durch Punktmutagenese konnten in dieser Arbeit mehrere Aminosäuren auf ihre Funktion beim Kerntransport von Tec1 mittels NLS1 untersucht werden. Die Punktmutationen konnten in drei Kategorien eingeteilt werden: solche ohne Effekt auf die Kernlokalisierung, solche die einen leichten Effekt auf die Kernlokalisierung haben und solche, die die Funktion der NLS komplett verhindern. Die untersuchten Aminosäuren liegen alle in der TEA-Domäne, welche eine Helix-Loop-Helix-Loop-Helix-Struktur hat (Anbanandam *et al.*, 2006). Die in Helix 1 mutierten Aminosäuren R145, L144 und L146 von Tec1 spielten keine oder nur eine untergeordnete Rolle bei der Kernlokalisierung. Im Loop 1 hingegen konnten mehrere Aminosäuren als kritisch identifiziert werden (K149, K154, K156, G163 und R164). Die beiden basischen Reste K173 und K175 aus Helix 2 wurden mutiert und beide hatten keinen Effekt auf die Kernlokalisierung. Die in dem kurzen Loop 2 und der Helix 3 untersuchten Aminosäuren spielten wiederum alle eine Rolle bei der Funktion der NLS1 (K182, Q184, S186, S187, Q190 und K194). Anhand der Sekundärstruktur kann also gefolgert werden, dass Helix 1 und Helix 2 keine große Bedeutung für den Kerntransport mittels NLS1 haben, während Loop 1, Loop 2 und Helix 3 wichtig sind.

Um eine mögliche Importinbindestelle zu identifizieren, ist jedoch die Kenntnis der Tertiärstruktur der Domäne erforderlich, damit man die räumliche Anordnung der Aminosäuren sieht. Da die Struktur der TEA-Domäne des humanen Proteins TEF-1 durch NMR-Spektroskopie aufgeklärt wurde und diese im Bereich der DNA-Bindedomäne zu 44 % identisch mit der von Tec1 ist (Bürglin, 1991), konnte die Struktur der Tec1-TEA-Domäne modelliert werden. Dazu wurde der „Protein structure homology-modelling“-Server „Swiss Model“ verwendet (<http://swissmodel.expasy.org>)



Mit dem „Protein structure homology-modelling“-Server „Swiss Model“ (<http://swissmodel.expasy.org>) (Arnold *et al.*, 2006; Kiefer *et al.*, 2009) wurde ein Strukturmodell der TEAD von Tec1 nach der NMR-Struktur der TEAD von TEF-1 (Anbanandam *et al.*, 2006) erstellt. Durch Drehung der Figur A) um 180°C nach hinten entsteht Figur C). Figur B) und D) sind jeweils die gleichen Ansichten wie A) und C), hier ist zusätzlich die Oberfläche des Proteins dargestellt. Die Struktur der TEAD besteht aus drei Helices (H1, H2 und H3) und zwei Loop-Regionen (L1 und L2). Die in dieser Arbeit in dem Protein GFP-Tec1^{AS1-240} mutierten Aminosäurereste sind farblich gekennzeichnet: rot = essentiell, orange = wichtig und grün = nicht wichtig für die Kernlokalisierung via NLS1.

85

kritischen Resten für die Kernlokalisierung erklären. Die Reste, deren Austausch gegen Alanin eine Reduzierung der NLS-Funktion zur Folge hatte, befinden sich in einem anderen Bereich der TEA-Domäne. Sie liegen nicht alle in einer Ebene, sondern sind auf verschiedenen Seiten des Proteins exponiert und die Aminosäure L144 liegt wahrscheinlich im Inneren der Domäne (Abb. 3.2, orange eingefärbte Reste). Diese Aminosäurereste könnten für die generelle Struktur der Domäne bzw. der NLS1 von Bedeutung sein. Ist die räumliche Anordnung der für die Interaktion mit den Importinen kritischen Reste verändert, könnten wichtige Kontakte nicht mehr gebildet werden. Die drei Aminosäuren, deren Austausch keine Auswirkung auf die Kernlokalisierung hatte (R145, K173 und K175) liegen in einer gemeinsamen Ebene in der Tertiärstruktur der TEA-Domäne (Abb. 3.2, grün eingefärbte Reste). Die kritischen Reste und die ohne Einfluss auf die Kernlokalisierung befinden sich jedoch auf gegenüberliegenden Seiten der globulären TEA-Domäne. Demnach ist die Seite der Domäne, auf der die Reste R145, K174 und K175 liegen, vermutlich nicht an der Importin-Interaktion beteiligt.

Generell lässt sich festhalten, dass die NLS1 eine große Interaktionsfläche mit den Importinen hat, die durch die Struktur der TEA-Domäne gebildet wird. Es werden vermutlich viele Kontakte mit den Importinen ausgebildet, von denen mehrere für die Interaktion essentiell sind. Einige dieser kritischen Aminosäuren sind basisch (K149, K154, K156, R164 und K194). Da Karyopherine eine negative Nettoladung haben, könnten durch diese Reste elektrostatische Interaktionen mit der konkaven Innenseite der Importine ausgebildet werden. Diese Reste liegen in dem Strukturmodell auch auf einer horizontalen Ebene. Des Weiteren sind zwei Glutaminreste und ein Serinrest (Q184, Q190 und S187) kritisch für die NLS1-Funktion. Diese Reste sind zwar ungeladen, aber polar und könnten demnach auch elektrostatischen Wechselwirkungen eingehen. Schließlich ist noch ein Glycinrest (G163) für die Funktion wichtig. Erstaunlicherweise hat der Austausch dieser Aminosäure gegen Alanin einen starken Effekt auf den Kerntransport, obwohl sich die beiden Reste nur in einer Methylgruppe unterscheiden. Möglicherweise könnte diese jedoch die Struktur der Domäne negativ beeinflussen.

3.2.2.3 Mehrere Aminosäuren sind kritisch für die Bindung von Tec1 an TCS-Elemente *in vitro* und die Transkriptionsaktivierung *in vivo*

Die Aminosäuren, die auf ihre Funktion bei der Kernlokalisierung getestet wurden, sind zum größten Teil auch auf ihre Rolle bei der Bindung von TCS-Elementen und der Genaktivierung über diese DNA-Elemente untersucht worden. Der Austausch der Aminosäuren L144, R145 und L146 in Helix 1 hatten keinen Effekt auf die TCS-Bindung *in vitro*. Auch die TCS-Aktivierung *in vivo* war nach Mutation von L144 und R145 zu Alanin nicht beeinträchtigt. Die Mutation L146A hatte einen leichten Effekt auf die Genaktivierung über TCS-Elemente, was darauf hindeutet, dass dieser Rest eine von der DNA-Bindung unabhängige Funktion für die Transaktivierung hat. Eine andere Möglichkeit wäre jedoch auch, dass die Punktmutation die Stabilität des Proteins negativ beeinflusst, wodurch dieses dann in geringerer Konzentration in der Zelle vorhanden wäre und daher die Genaktivierung nicht im gleichen Maße wie durch das Wildtypprotein möglich wäre.

In der Region von Loop 1 wurden viele Aminosäureaustausche vorgenommen. Die Aminosäure Asparagin an Position 161 konnte gegen Alanin ausgetauscht werden, ohne dass dies einen Effekt auf die DNA-Bindung *in vitro* hatte. In den TEA-Domänen der meisten Organismen ist an dieser Position ein Glycinrest, selbst in dem Tec1-Homolog aus *Candida albicans*. Dieser Glycinrest in TEF-1 zeigte in einem ^1H , ^{15}N -heteronuclear single quantum coherence-Spektrum eine chemische Verschiebung bei Bindung an die DNA (Anbanandam *et al.*, 2006). Daher ist dieser Rest in TEF-1 wahrscheinlich an der DNA-Bindung beteiligt. In Tec1 aus *S. cerevisiae* ist diese Aminosäure nicht konserviert und der Asparaginrest an dieser Position ist auch nicht für die DNA-Bindung kritisch. Die Aminosäure Lysin an Position 156 ist für die DNA-Bindung von Tec1 von Bedeutung, denn eine Mutation zu Alanin bewirkt eine um ca. 50 % verminderte DNA-Bindeaktivität. Die TCS-Aktivierung *in vivo* ist bei dieser Mutante etwa gleichermaßen beeinträchtigt, woraus sich schließen lässt, dass dies auf die verminderte DNA-Bindung zurückzuführen ist. Der gleichzeitige Austausch von K154 und I155 gegen Alanin hatte einen starken Effekt auf die DNA-Bindung. Beide Reste sind konserviert. Bei der TCS-Aktivierung *in vivo* wurde nur die Einzelmutante Tec1^{K154A} gemessen. Sie konnte nur eine schwache Aktivierung der Genexpression bewirken. Möglicherweise hat daher auch die Einzelmutation K154A schon einen starken Effekt auf die DNA-Bindung. Die Mutation G163A bewirkt, dass die TCS-Bindung nur noch sehr eingeschränkt möglich ist und die *in vivo*-Aktivierung komplett

blockiert ist. Diese Aminosäure liegt in einem stark konservierten Bereich der TEA-Domäne, der wahrscheinlich eine wichtige Funktion bei der DNA-Bindung hat. Auch die Aminosäuren K154 und R164 sind hoch konserviert und ihr Austausch hat einen sehr starken Effekt auf die Funktion der TEA-Domäne. Sowohl TCS-Bindung als auch -Aktivierung sind vollständig inhibiert. Demnach spielen viele Aminosäuren in der Region des Loop 1 der TEA-Domäne eine wichtige Rolle bei der DNA-Bindung.

In Helix 2 wurden nur die Aminosäuren K173 und K175 als Doppelmutante auf ihre Funktion bei der TCS-Aktivierung untersucht. Erstaunlicherweise war die Aktivierung sogar leicht höher als die des Wildtypproteins. Dies könnte auf eine erhöhte Proteinstabilität zurückzuführen sein. Die TCS-Bindung wurde nicht untersucht, jedoch ist es sehr wahrscheinlich, dass diese nicht betroffen ist. In Helix 2 konnten demnach keine für die DNA-Bindung bzw. TCS-Aktivierung kritischen Reste identifiziert werden.

Die in Loop 2 und Helix 3 untersuchten Aminosäuren waren alle an der DNA-Bindung bzw. TCS-Aktivierung beteiligt (K182, Q184, S186, S187 und K194). Der Austausch der Reste K182 und S186 hatte einen leichten Effekt auf beide Funktionen, während Mutation von S187 und Q190 einen sehr starken Effekt hatte, was bedeutet, dass diese beiden Reste eine entscheidende Rolle spielen. Die Punktmutanten Q184A und K194A wurden nur auf ihre *in vivo* TCS-Aktivierung untersucht. Diese war stark beeinträchtigt, was vermuten lässt, dass auch die TCS-Bindung kaum noch möglich ist.

Loop 1, Loop 2 und Helix 3 der TEA-Domäne sind also sehr wichtig für die TCS-Bindung und -Aktivierung, während Helix 1 und Helix 2 eine untergeordnete Rolle spielen. Die gleichen Bereiche der TEA-Domäne waren auch für die Funktion der NLS1-vermittelten Kernlokalisierung entscheidend (Abschnitt. 3.2.2.2).

Um die Bedeutung und Funktion der einzelnen Aminosäuren besser verstehen zu können, wurde hier ein Modell der TEA-Domäne verwendet, bei dem die mögliche Kontaktstelle zur DNA dargestellt ist. Die TEA-Domäne ist der Homöodomäne des Proteins MatA1 sehr ähnlich. Eine DNA-gebundene Struktur des Heterodimers MatA1/Mat α 2 wurde durch Kokristallisation aufgeklärt (Wolberger *et al.*, 1991; Wolberger *et al.*, 1991). Durch Superimposition konnte ein Modell der Tec1-TEA-Domäne mit der DNA erzeugt werden (Abb. 3.3). Die Helix 3 der TEA-Domäne ist die Erkennungshelix und interagiert mit den Basen in der großen Furche der DNA (Anbanandam *et al.*, 2006).

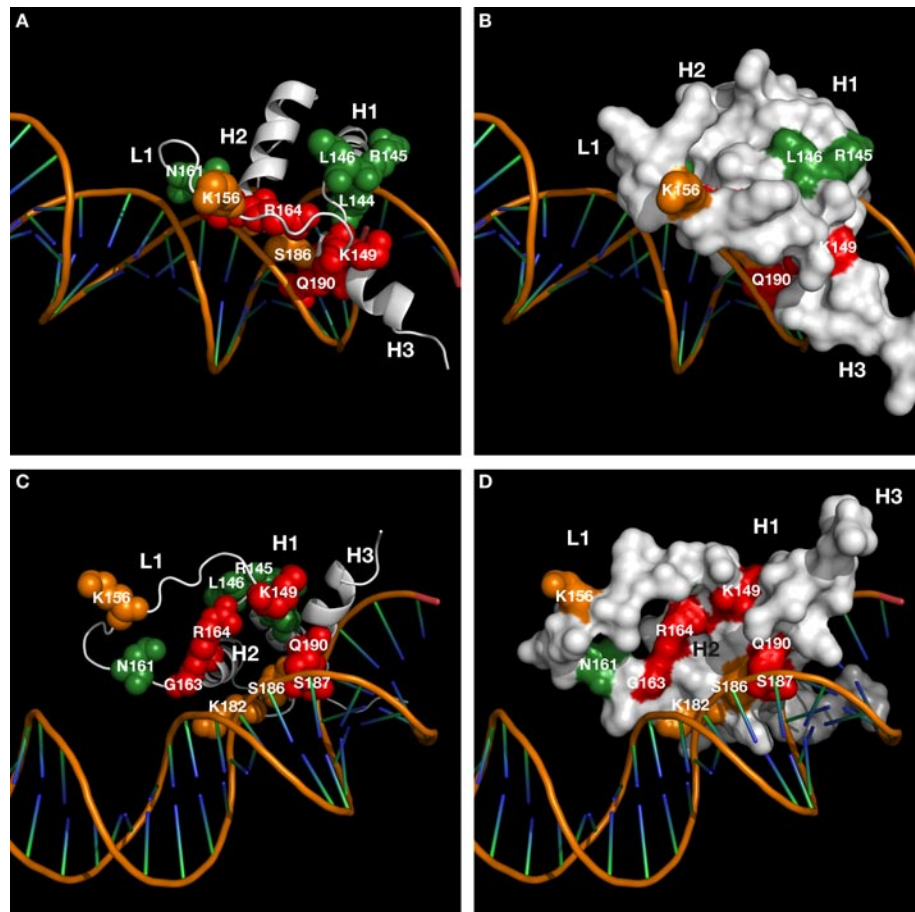


Abb. 3.3: Verschiedene Ansichten des Strukturmodells der DNA-gebundenen TEA-Domäne von Tec1. Mit dem „Protein structure homology-modelling“-Server „Swiss Model“ (<http://swissmodel.expasy.org>) (Arnold *et al.*, 2006; Kiefer *et al.*, 2009) wurde ein Strukturmodell der TEAD von Tec1 nach der NMR-Struktur der TEAD von TEF-1 (Anbanandam *et al.*, 2006) erstellt. Durch Superimposition der DNA-gebundenen Struktur des Heterodimers MataA1/Mata2 (Wolberger *et al.*, 1991; Wolberger *et al.*, 1991) konnte das DNA-gebundene Modell der TEAD von Tec1 erstellt werden. Die Figuren A) und C) sind unterschiedliche Ansichten des Modells, bei den Figuren B) und D) ist die Oberfläche der in A) und C) gezeigten Moleküle dargestellt. Die Struktur der TEAD besteht aus drei Helices (H1, H2 und H3) und zwei Loop-Regionen (L1 und L2). Die in dieser Arbeit in dem Protein MBP-Tec1 mutierten Aminosäurereste sind farblich gekennzeichnet: rot = essentiell, orange = wichtig und grün = nicht wichtig für die Bindung der TEAD von Tec1 an TCS-Elemente in der DNA.

Mit Ausnahme von L144 sind alle in Bezug auf die DNA-Bindung untersuchten Aminosäurereste an der Oberfläche der modellierten TEA-Domäne exponiert und damit für Interaktionen zugänglich. Die beiden Reste R145 und L146, deren Austausch keinen Effekt auf die DNA-Bindung hat, liegen auf der Seite der Domäne, die nicht in Kontakt mit der DNA steht. Die Aminosäure N161, die ebenfalls nicht für die DNA-Bindung kritisch ist, befindet sich zwar an der DNA-zugewandten Seite des Proteins, hat aber keine räumliche Nähe zur DNA. Der Austausch der Aminosäuren K156, K182 und S186 hatte einen leichten Effekt auf die TCS-Bindung. Lysin 182 und Serin 186 liegen im Modell sehr nah an der DNA und könnten daher Interaktionen mit dieser eingehen.

Möglicherweise stellen diese Reste einen Kontakt zum Rückgrat des DNA-Strangs her und stabilisieren so die Interaktion mit der DNA. Die Aminosäure S186 ist konserviert und zeigte in TEF-1 eine chemische Verschiebung im ^1H , ^{15}N -heteronuclear single quantum coherence-Spektrum bei Bindung an die DNA (Anbanandam *et al.*, 2006). Der Aminosäurerest K156 ist sehr weit von der DNA entfernt und spielt dennoch eine Rolle bei der DNA-Interaktion. Er könnte für die kooperative Bindung von Tec1-Proteinen an benachbarte TCS-Elemente wichtig sein und auf diese Weise die DNA-Bindung begünstigen. Die Aminosäurereste, die kritisch für die TCS-Bindung sind (K149, G163, R164, S187 und Q190) liegen alle auf der der DNA zugewandten Seite der Proteindomäne. Besonders die Reste S187 und Q190, die in Helix 3 liegen, sind sehr nah an der großen Furche der DNA und könnten daher für spezifische Kontakte mit den Basen verantwortlich sein. Die Mutation jeder dieser Aminosäuren hat entsprechend einen kompletten Verlust der DNA-Bindeaktivität und der TCS-Aktivierung zur Folge. Die Reste G163, R164 und vor allem K149 liegen im Modell weiter von der DNA entfernt und könnten daher wichtig für die Ausbildung der korrekten Struktur sein.

3.2.2.4 Mehrere Aminosäuren in der TEA-Domäne von Tec1 sind sowohl für die Kernlokalisierung als auch die TCS-Bindung entscheidend

Die NLS1 von Tec1 wurde auf einen Bereich von 115 Aminosäuren eingegrenzt und überlappt mit der gesamten DNA-Bindedomäne. Es gibt viele Beispiele für Proteine, bei denen die NLS in der DNA-Bindedomäne liegt. Für die Proteine NGF1-A (humaner Zink-Finger Transkriptionsfaktor), Opaque-2 (Transkriptionsfaktor mit Leucin-Zipper aus *Zea mays*), Aktivator-Transposase (*Zea mays*), dHSF (Hitzeschock-Transkriptionsfaktor aus *Drosophila melanogaster*), Vp1 (Hauptcapsid-Protein von SV40), DAF-12 (Transkriptionsfaktor aus *Caenorhabditis elegans*) und $\alpha 2$ -Repressor (Homöodomänen-Protein aus *S. cerevisiae*) konnte durch Punktmutagenese gezeigt werden, dass die Funktionen DNA-Bindung und Kernimport voneinander unabhängig sind (Hall *et al.*, 1990; Matheny *et al.*, 1994; Varagona & Raikhel, 1994; Boehm *et al.*, 1995; Zandi *et al.*, 1997; Li *et al.*, 2001; Shostak & Yamamoto, 2005). Mutationen, welche die DNA-Bindung verhinderten, hatten keinen oder nur einen schwachen Einfluss auf die Kernlokalisierung.

Für Tec1 hatte der Austausch von sechs Aminosäuren in der TEA-Domäne einen starken Effekt auf die DNA-Bindung (Tabelle 4, rote Schrift). Wahrscheinlich ist auch

bei den Punktmutanten Q184A und K194A die DNA-Bindung stark gestört. Diese acht Mutationen hatten auch einen starken Effekt auf die Kernlokalisierung mittels NLS1 (Tabelle 4, rote Schrift; Abb. 3.2 und Abb. 3.3 rot markierte Reste). Bei drei Punktmutationen war jeweils ein leichter Effekt auf DNA-Bindung und Kernlokalisierung zu beobachten (Tabelle 4, orange Schrift; Abb. 3.2 und Abb. 3.3 orange markierte Reste).

Tabelle 4: Die Auswirkungen verschiedener Aminosäureaustausche auf die Kernlokalisierung (N/C-Relation), TCS-Bindung bzw. TCS-Aktivierung von Tec1.

N/C-Relation	TCS-Bindung	TCS-Aktivierung	Mutationen
kein Effekt	kein Effekt	kein Effekt	R145A, K173A, K175A
leichter Effekt	leichter Effekt	leichter Effekt	K156A, K182A, S186A
starker Effekt	starker Effekt	starker Effekt	K149A, K154A, G163A, R164A, Q184A, S187A, Q190A, K194A
leichter Effekt	kein Effekt	kein oder leichter Effekt	L144A, L146A, N161A

Klassifizierung: kein Effekt (100–76 % vom Wildtyp), leichter Effekt (75–37 % vom Wildtyp) und starker Effekt (36–0 % vom Wildtyp). Farbliche Kennzeichnung: rot = essentiell, orange = wichtig, grün = nicht wichtig für die Bindung der TEAD von Tec1 an TCS-Elemente in der DNA und für die NLS1-vermittelte Kernlokalisierung. Blau = wichtig für die NLS1-vermittelte Kernlokalisierung, aber nicht für die TCS-Bindung.

Anhand des Strukturmodells wird deutlich, dass diese Aminosäuren alle in einer gemeinsamen Ebene der TEA-Domäne liegen (Abb. 3.4 rot und orange eingefärbte Reste). Somit stellt diese Ebene wahrscheinlich eine Interaktionsfläche für die Bindung an die DNA und die Importine dar. Die Reste, die keine wichtige Funktion für DNA-Bindung bzw. Kernlokalisierung haben, sind von dieser Ebene weit entfernt (Tabelle 4, grüne Schrift und Abb. 3.4, grün eingefärbte Reste). Für viele Aminosäuren konnte also gezeigt werden, dass sie jeweils sowohl für die DNA-Bindung als auch für die Kernlokalisierung die gleiche Rolle spielen. Allerdings wurden auch drei Punktmutationen charakterisiert, die unterschiedliche Auswirkungen auf die beiden Funktionen hatten (Tabelle 4, blaue Schrift und Abb. 3.4, blau eingefärbte Reste). Die Mutation von L144 hat keinen Effekt auf die DNA-Bindung und die TCS-Aktivierung, jedoch ist die Kernlokalisierung schwächer als beim Wildtyp. Da diese Aminosäure dem Modell zufolge nicht an der Oberfläche exponiert ist, hat sie vermutlich eine strukturelle Funktion. Der Austausch der Aminosäuren L146 und N161 hat ebenfalls keine Auswirkung auf die Bindung an die DNA, jedoch sind hier sowohl die Kernlokalisierung als auch die TCS-Aktivierung schwächer als die des Wildtypproteins.

Die Ursache hierfür könnte sowohl struktureller Natur sein, als auch auf fehlende Kontaktstellen zurückzuführen sein.

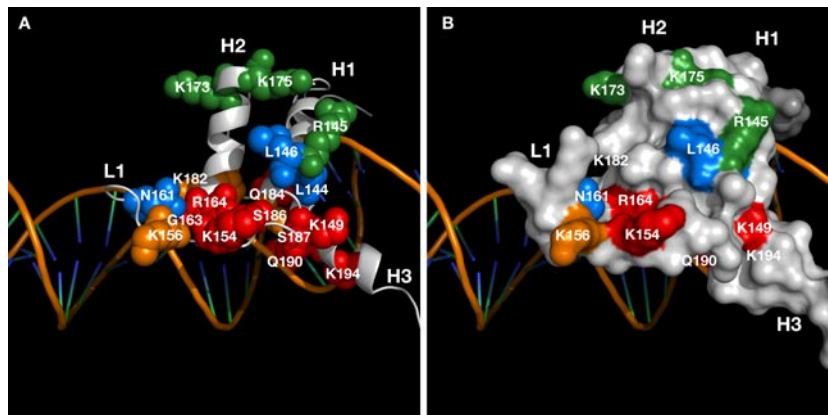


Abb. 3.4: Strukturmodell der DNA-gebundenen TEA-Domäne von Tec1. Mit dem „Protein structure homology-modelling“-Server „Swiss Model“ (<http://swissmodel.expasy.org>) (Arnold *et al.*, 2006; Kiefer *et al.*, 2009) wurde ein Strukturmodell der TEAD von Tec1 nach der NMR-Struktur der TEAD von TEF-1 (Anbanandam *et al.*, 2006) erstellt. Durch Superimposition der DNA-gebundenen Struktur des Heterodimers MatA1/MatA2 (Wolberger *et al.*, 1991; Wolberger *et al.*, 1991) konnte das DNA-gebundene Modell der TEAD von Tec1 erstellt werden. In Figur A) sind die Atome der in dieser Arbeit untersuchten Aminosäuren als Kugeln dargestellt, in Figur B) ist die Oberfläche des in A) gezeigten Moleküls dargestellt. Die Struktur der TEAD besteht aus drei Helices (H1, H2 und H3) und zwei Loop-Regionen (L1 und L2). Farbliche Kennzeichnung: rot = essentiell, orange = wichtig, grün = nicht wichtig für die Bindung der TEAD von Tec1 an TCS-Elemente in der DNA und für die NLS1-vermittelte Kernlokalisierung. Blau = wichtig für die NLS1-vermittelte Kernlokalisierung, aber nicht für die TCS-Bindung.

Es konnte also gezeigt werden, dass die Kernlokalisierung auch beeinträchtigt sein kann, wenn die DNA-Bindung noch vollständig funktioniert. Daraus lässt sich schließen, dass sich die Funktionen TCS-Bindung und Kerntransport zumindest teilweise trennen lassen und damit die Kernlokalisierung nicht nur auf eine Retention im Zellkern durch Bindung an die DNA zurückzuführen ist. Jedoch wurde keine Punktmutante identifiziert, die eine vollständige Trennung der beiden Funktionen zeigt und auch keine, bei der die DNA-Bindung gestört war und die Kernlokalisierung noch funktioniert hat. Es besteht also eine enge Verbindung beider Funktionen. Dies könnte mit einer möglichen Ko-Evolution von DNA-Bindedomäne und NLS zusammenhängen. Die Struktur der DNA-Bindedomäne ist anscheinend für die Interaktion mit der DNA und mit den Importinen wichtig, wobei die Importine vermutlich mit einem größeren Bereich der Domäne interagieren. Dass der gleiche Bereich der TEA-Domäne für beide Interaktionen genutzt wird, könnte die Funktion haben, dass die basischen Aminosäuren im Zytoplasma durch Bindung von Importinen abgeschirmt werden.

3.2.2.5 Die DNA-Bindedomäne „verankert“ Tec1 im Zellkern durch Bindung an die DNA

Bei den für diese Arbeit durchgeführten Versuchen konnte festgestellt werden, dass der Transkriptionsfaktor Tec1 auch nach Hemmung des rezeptorvermittelten Transports durch Zugabe von Natriumazid und 2-Desoxyglukose im Zellkern bleibt und sich kein neues Gleichgewicht einstellt (Abb. 2.16). Auch für das Fusionsprotein GFP-Tec1^{AS 125–240}, welches die DNA-Bindedomäne enthält, wurde dieser Effekt beobachtet (Abb. 2.16). Bei dem Protein GFP-Tec1^{AS 301–400}, das nicht spezifisch an die DNA binden kann, stellt sich nach Hemmung des rezeptorvermittelten Transports innerhalb weniger Minuten ein neues Gleichgewicht ein (Abb. 2.16). Diese Beobachtungen lassen sich dadurch erklären, dass Tec1 im Zellkern an die DNA bindet. Dabei ist der Großteil der Moleküle wahrscheinlich spezifisch an TCS-Elemente gebunden, von denen es im Hefegenom 10692 gibt (Saccharomyces Genome Database: Yeast Genome Pattern Matching; <http://www.yeastgenome.org/cgi-bin/PATMATCH/nph-patmatch>). Aber auch unspezifische Interaktionen mit der DNA sind möglich, da die DNA-Bindedomäne durch die vielen basischen Aminosäuren über elektrostatische Wechselwirkungen an die negativ geladene DNA binden kann. Punktmutationen in der TEA-Domäne, die eine Bindung an TCS-Elemente verhindern, bewirken auch, dass das Protein weniger stark im Kern festgehalten wird, wenn der rezeptorvermittelte Transport gehemmt ist (Abb. 2.16).

Welche Rolle die Retention von Proteinen im Zellkern durch DNA-Bindedomänen bei der Kernlokalisierung spielt, war seit Aufstellung dieser Hypothese umstritten. Es wurde beschrieben, dass die Verweildauer von Proteinen im Kern von einer Bindung an die DNA oder an andere Strukturen abhängt (Schmidt-Zachmann & Nigg, 1993). Vor Kurzem wurde gezeigt, dass der Transkriptionsfaktor Tfg2 aus *S. cerevisiae* durch Bindung an die DNA im Zellkern gehalten wird und dass die DNA-Bindedomäne für die Kernlokalisierung notwendig ist (Süel & Chook, 2009). Interessanterweise korreliert in diesem Fall die zelluläre Lokalisierung von DNA-Bindemutanten mit der noch vorhandenen DNA-Bindeaktivität (Süel & Chook, 2009). In dieser Studie wurde allerdings nicht untersucht, ob die DNA-Bindedomäne von Tfg2 auch hinreichend für Kernlokalisierung ist. Die Autoren vermuten, dass neben der gut charakterisierten TY-NLS noch ein weiteres Kernlokalisierungssignal vorhanden sein könnte (Süel & Chook, 2009). Theoretisch könnte auch in diesem Protein die DNA-Bindedomäne eine NLS enthalten, die durch verschiedene Punktmutanten gestört werden kann und die

gleichzeitig auch für die DNA-Bindung kritisch sind – wie dies in Tec1 vermutlich der Fall ist.

Eine Retention im Zellkern durch Bindung an die DNA ist bisher bei sehr wenigen Proteinen beschrieben worden. Es ist jedoch wahrscheinlich ein genereller Faktor der Kernlokalisierung von DNA-Bindeproteinen, da die hohe Affinität zur DNA immer eine „Verankerung“ im Zellkern zur Folge hat. Dass die Bindung an die DNA hinreichend für die Kernlokalisierung ist, indem das DNA-Bindeprotein über Diffusion oder indirekten Transport in den Kern gelangt und sich dort anreichert, wurde meines Wissens bisher für kein Protein gezeigt. Auch bei Tec1 ist der NLS1-vermittelte Kernimport höchst wahrscheinlich rezeptorabhängig und die Bindung an die DNA nur ein zusätzlicher Faktor der Kernakkumulation. Ein solcher Mechanismus des passiven Imports und der Anreicherung eines Proteins im Zellkern durch DNA-Bindung ist für die meisten Proteine mit Sicherheit nicht effizient genug und könnte höchstens im Laufe der Entwicklung als Vorstufe des rezeptorvermittelten Kernimports gedient haben.

3.2.3 Die NLS2 von Tec1 überlappt mit der Ste12-Bindedomäne

3.2.3.1 Die NLS2 von Tec1 stellt vermutlich ein strukturelles Lokalisierungssignal dar, bei dem zwei basische Reste kritisch sind

Die NLS2 von Tec1 umfasst einen Bereich von 100 Aminosäuren, in dem 15 Arginin- bzw. Lysinreste zu finden sind. Diese Aminosäuren wurden zu Alanin mutiert, wobei teilweise mehrere Reste gleichzeitig ausgetauscht wurden. Die beiden benachbarten Aminosäuren Lysin 318 und Arginin 319 wurden als für die Funktion der NLS2 erforderlich identifiziert. Die Mutation einer oder beider Aminosäuren zu Alanin bewirkt eine starke Beeinträchtigung des Kerntransportes, jedoch nicht den kompletten Verlust der Funktion. Der Wert der nukleozytoplasmatischen Relation ist im Vergleich zu freiem GFP noch leicht erhöht. Der Austausch der anderen untersuchten Aminosäuren gegen Alanin hatte keinen nennenswerten Effekt auf die Kernlokalisierung. Da ein relativ großer Bereich des Tec1-Proteins für die Funktion der NLS2 erforderlich ist und nur zwei Aminosäuren als kritisch identifiziert werden konnten, spricht dies dafür dass die Sekundär- oder auch die Tertiärstruktur der NLS von Bedeutung für die Importinbindung ist. Die beiden Aminosäuren K318 und R319 könnten für die Ausbildung der korrekten Struktur der NLS wichtig sein. Eine andere Möglichkeit ist, dass diese beiden basischen Reste elektrostatische Wechselwirkungen

mit dem negativ geladenen Importin eingehen und somit bei der Interaktion eine wichtige Rolle spielen. In beiden Fällen hätten die beiden Aminosäuren redundante Funktionen, die nicht kumulativ sind, denn der Austausch einer der Reste K318 bzw. R319 in GFP-Tec1^{AS 256–400} hat den gleichen Effekt wie die Doppelmutante. Alle drei Punktmutanten bewirken zwar eine starke Beeinträchtigung des Kernimports, eine Restaktivität bleibt jedoch erhalten. Eine schwache Bindung an die Importine ist somit wahrscheinlich noch möglich.

Die zu K318 und R319 benachbarten Reste P316, S317, P320 und L321 sind gegen Alanin austauschbar ohne dass dies einen Effekt auf den Kernimport via NLS2 hat (Wittkowski, 2009). In Tec1 liegen die beiden für die NLS2 kritischen Reste in der Sequenzfolge ³¹⁷SKRP³²⁰. Interessanterweise ist in dem Transkriptionsfaktor Aft1 genau die gleiche Sequenz zu finden (³³²SKRP³³⁵). Diese Aminosäurefolge ist in einer der beiden NLSs von Aft1 zu finden und die Mutation aller vier Reste zu Alanin ist notwendig, um die Kernlokalisierung von Aft1 zu schwächen (Ueta *et al.*, 2003). Diese Aminosäuren könnten demnach ein Motiv darstellen, das die Ausbildung einer Sekundärstruktur gewährleistet, die für die Interaktion mit bestimmten Importinen erforderlich ist.

Des Weiteren ist interessant, dass die Aminosäuren 380–400 von Tec1 zur Effizienz des Kernimports beitragen. Denn ein GFP-Fusionsprotein mit den Aminosäuren 310–379 von Tec1 ist zwar noch im Kern lokalisiert, aber deutlich schlechter. In diesem Bereich wurden keine Aminosäuren mutiert, da hier keine basischen Reste zu finden sind und auch keine Konservierung der Sequenz zwischen verschiedenen Organismen vorliegt. Diese 21 Aminosäuren am Ende der NLS könnten zur korrekten Faltung des Proteins beitragen oder die Interaktion mit dem Importin stabilisieren und damit die Effizienz des Kernimports erhöhen.

3.2.3.2 Die Aminosäurereste K318 und R319 sind nicht für die Transkriptionsaktivierung durch Tec1 kritisch

Die Punktmutationen K318A und R319A in der NLS2 von Tec1 wurden auch auf ihre Auswirkung auf die Transkriptionsaktivierung über TCS-Elemente untersucht. Die Proteine Tec1^{K318A} und Tec1^{R319A} werden mit geringerer Effizienz als das wildtypische Tec1 in den Zellkern transportiert, jedoch sind die Gene dieser Proteine auch überexprimiert und daher könnte die Anzahl der in den Kern transportierten Moleküle

für eine wildtypische TCS-Aktivierung ausreichen. Tatsächlich wurde auch kein negativer Effekt bei den Punktmutanten beobachtet. Erstaunlicherweise war die Transkriptionsaktivierung über die TCS-Elemente gegenüber dem Wildtypprotein sogar um 22 % bzw. 36 % erhöht. Die Mutationen K318A und R319A liegen nicht im Bereich der Aktivierungsdomäne von Tec1, daher ist eine durch diese Aminosäureaustausche verbesserte Transkriptionsaktivierung sehr unwahrscheinlich. Jedoch liegen die Punktmutationen im Bereich der Ste12-Binderegion. Daher könnte es sein, dass die Affinität zu dem Transkriptionsfaktor Ste12 erhöht ist und die Verbesserung der Transkriptionsaktivität über die Aktivierungsdomäne von Ste12 erfolgt.

Die Doppelmutanten, bei denen beide NLSs mutiert sind, zeigen wie erwartet keine Aktivierung mehr, da sie einerseits nicht mehr an die TCS-Elemente binden können und andererseits auch nur wenige Moleküle in den Zellkern transportiert werden.

3.2.3.3 Der Kerntransport mittels NLS2 ist nicht von Ste12 abhängig

Die NLS2 in der C-terminalen Hälfte von Tec1 wurde auf die Aminosäuren 301–400 begrenzt. Diese Region entspricht genau der, die für die Interaktion mit dem Transkriptionsfaktor Ste12 notwendig ist (Chou *et al.*, 2006), was die Vermutung nahe legt, dass Ste12 für den Kernimport notwendig sein könnte.

In einer früheren Studie wurde bereits festgestellt, dass die Kernlokalisierung von Tec1 auch in Abwesenheit von Ste12 erfolgen kann (Köhler *et al.*, 2002). Zu dieser Zeit war allerdings noch nicht bekannt, dass es zwei Bereiche in Tec1 gibt, die Kernlokalisierung vermitteln. In der vorliegenden Arbeit konnte nun gezeigt werden, dass die Fragmente von Tec1, die nur eine NLS enthalten, ebenfalls in Abwesenheit von Ste12 im Kern lokalisieren (Abb. 2.6). Demzufolge ist Ste12 für die Kernlokalisierung von Tec1 nicht notwendig. Es kann allerdings auch nicht ausgeschlossen werden, dass Tec1 teilweise als Komplex mit Ste12 und einem Importin in den Kern transportiert wird und dabei möglicherweise nur die NLS von Ste12 genutzt wird.

3.2.3.4 Die NLS2 von Tec1 vermittelt rezeptorabhängigen Kernimport

Durch die FRAP-Analyse konnte für die NLS2 von Tec1 gezeigt werden, dass sie rezeptorabhängigen Kernimport vermittelt. Nach dem Bleichen der GFP-Tec1^{AS 301–400}-Moleküle im Zellkern konnte eine Wiederkehr der Fluoreszenz innerhalb des Messzeitraums von 97,2 Sekunden festgestellt werden. Durch Hemmung des rezeptor-

vermittelten Transportes in der Zelle konnte die Regeneration der Fluoreszenz im Zellkern deutlich verlangsamt werden. Eine geringe Wiederkehr der Fluoreszenz war noch möglich, was vermutlich auf Diffusion zurückzuführen ist, da das Protein gerade noch klein genug ist, um ohne Rezeptor durch die Kernpore zu gelangen. GFP-Tec1^{AS 301–400} wird demnach hauptsächlich durch Transportrezeptoren in den Zellkern transportiert, kann aber wahrscheinlich auch hinein diffundieren.

Die Regeneration der Fluoreszenz von GFP-Tec1^{AS 301–400} erscheint allerdings verglichen mit der von freiem GFP sehr langsam und es konnte nur 70 % der Ausgangsfluoreszenz im Zellkern wiederhergestellt werden. Theoretisch würde man erwarten, dass der rezeptorvermittelte Transport von GFP-Tec1^{AS 301–400} schneller ist, als die Diffusion von GFP-Molekülen. In den hier durchgeführten Messungen konnte dies nicht beobachtet werden. Wahrscheinlich ist der Grund dafür, dass GFP in höherer Konzentration in der Zelle vorliegt, als GFP-Tec1^{AS 301–400}. Daher ist die Wahrscheinlichkeit, dass ein leuchtendes GFP-Molekül in den Zellkern kommt größer, als dass ein GFP-Tec1^{AS 301–400}-Molekül hinein transportiert wird.

3.2.4 Die zwei NLSs in Tec1 ermöglichen effizienten Kerntransport

Es gibt sowohl in Hefe als auch in höheren Eukaryoten einige Beispiele für Proteine mit mehr als einer NLS. In den Transkriptionsfaktoren Gcn4 (Pries *et al.*, 2002) und Swi6 (Kim *et al.*, 2010) aus *S. cerevisiae* wurden jeweils zwei NLSs identifiziert. In Gcn4 liegen beide NLSs in der C-terminalen Hälfte des Proteins und die Deletion beider Bereiche ist notwendig, um den Kernimport von Gcn4 zu blockieren (Pries *et al.*, 2002). Während die NLS2 von dem Importin α/β -Heterodimer gebunden wird, ist die NLS1 vermutlich nicht auf ein bestimmtes Importin spezialisiert (Pries *et al.*, 2002). Swi6 enthält eine klassische NLS, die durch zellzyklusabhängige Phosphorylierung inhibiert werden kann und eine nicht-klassische NLS, die infolge von Zellwandstress inhibiert wird (Kim *et al.*, 2010). Es handelt sich also hier um zwei unabhängige NLSs, die den Import von Swi6 unter verschiedenen Bedingungen vermitteln. Auch in Vertebraten gibt es Beispiele für Proteine mit zwei NLS Sequenzen. Der Glukokortikoidrezeptor enthält zwei NLSs, die Import über verschiedene Mechanismen vermitteln (Picard & Yamamoto, 1987). Die so genannte NL1 liegt in der DNA-Bindedomäne, ist eine klassische NLS und vermittelt den Kernimport ligandenunabhängig. NL2 hingegen liegt in der Liganden-Bindedomäne und ist ligandenabhängig (Savory *et al.*, 1999). Ein

interessantes Beispiel ist der Transkriptionsfaktor Nrf2, der sogar über drei Kernlokalisierungssignale verfügt: eine klassische bipartite NLS (Jain *et al.*, 2005) und zwei weitere basische NLSs (Theodore *et al.*, 2008). Alle drei NLSs scheinen kritisch für die Kernlokalisierung zu sein, da die Mutation einer der NLSs den Kerntransport des Proteins negativ beeinflusst (Theodore *et al.*, 2008). Ein letztes Beispiel ist das Protein NUCKS („nuclear, casein kinase und cyclin-dependent kinase substrate“) aus Vertebraten, das nur 27 kDa groß ist, aber dennoch zwei NLSs besitzt, die dessen Transport vermitteln (Grundt *et al.*, 2007).

Es gibt also vielfältige Beispiele für Proteine mit mehreren NLSs. Oft vermitteln die einzelnen Kernlokalisierungssignale unterschiedliche Importmechanismen, wie z. B. signalabhängigen bzw. –unabhängigen Kernimport. Durch das Vorhandensein mehrerer NLSs im Protein könnte aber auch im Fall, dass eine NLS defekt ist, der Kernimport durch die andere NLS gewährleistet werden. Möglicherweise ist die Transportrate eines Proteins mit mehreren NLSs auch erhöht. Durch die Bindung mehrerer Importine kann das Protein eventuell besser mit den Kernporenkomplexen interagieren und diese schneller passieren.

Bei vielen Proteinen mit zwei (oder drei) NLSs wurde festgestellt, dass beide (alle drei) für eine effiziente Kernlokalisierung notwendig sind. Auch in dem in dieser Arbeit untersuchten Transkriptionsfaktor Tec1 sind beide NLSs für effiziente Kernlokalisierung notwendig. Punktmutationen, welche die Funktionalität jeweils einer der beiden NLSs stören, führen zu einer im Vergleich zum Wildtyp um 20–35 % reduzierten Kernlokalisierung des Tec1-Proteins. NLS1 und NLS2 wirken demnach kumulativ, um Tec1 effizient in den Kern zu leiten. Erst wenn beide NLSs durch jeweils eine Punktmutation beeinträchtigt werden, ist der Kernimport von Tec1 deutlich reduziert. Eine Restaktivität der beiden NLSs bleibt jedoch bestehen, da eine Punktmutation nicht ausreicht, um die Funktion der NLS2 vollständig zu blockieren und gegebenenfalls auch die mutierte NLS1 noch eine kleine Restaktivität hat.

3.3. Der Kerntransport von Tec1 erfolgt über mehrere Importine mit teilweise redundanter Funktion

3.3.1 Die Importine Mtr10, Kap104, Pse1, Kap95, Srp1, Kap114 und Kap120 vermitteln den Kernimport von Tec1

In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass der Transkriptionsfaktor Tec1 *in vitro* mit den Importinen Mtr10, Kap104, Pse1, Kap95, Srp1, Kap114 und Kap120 interagiert. Die Importine sind wahrscheinlich zumindest teilweise redundant für den Kernimport von Tec1, daher konnte bei der *in vivo*-Analyse der Importinmutanten kein Verlust der Kernlokalisierung beobachtet werden. Die Interaktion von MBP-Tec1 mit Pse1 kann durch Zugabe von RanGTP gelöst werden und ist damit spezifisch. Für die anderen mit Tec1 interagierenden Importine steht diese Untersuchung noch aus.

Da Tec1 zwei Kernlokalisierungssignale enthält, wurde überprüft, welche der Importine mit der NLS1 bzw. der NLS2 interagieren. Die mit der DNA-Bindedomäne überlappende NLS1 wurde von den Importinen Mtr10, Kap104, Srp1 und Kap114 gebunden. Mit der NLS2 interagierten sechs der sieben Importine, die an das Gesamtprotein Tec1 binden konnten, nämlich Kap104, Pse1, Kap95, Srp1, Kap114 und Kap120. Mit Mtr10 wurde keine Interaktion festgestellt. Beide Kernlokalisierungssignale werden also demzufolge von Kap104, Srp1, Kap114 und Kap120 erkannt und gebunden. Die Transportrezeptoren Pse1 und Kap95 sind spezifisch für die NLS2, während das Protein Mtr10 nur mit der NLS1 von Tec1 interagiert (Tabelle 5).

Tabelle 5: Mit Tec1 bzw. dessen Kernlokalisierungssignalen (NLS1 und NLS2) interagierende Importine

	Tec1	NLS1	NLS2
Kap104	+	+	+
Srp1	+	+	+
Kap114	+	+	+
Mtr10	+	+	-
Pse1	+	-	+
Kap95	+	-	+
Kap120	+	-	+
Pdr6	-	-	-
Kap123	-	n.d.	n.d.
Nmd5	-	n.d.	n.d.
Sxm1	-	n.d.	n.d.

nachgewiesene Proteininteraktion (+);
keine Interaktion festgestellt (-)

Was ist bekannt über die mit den NLSs von Tec1 interagierenden Importine? Sehr gut erforscht ist das Importin Pse1, welches mit der NLS2 von Tec1 interagiert. Als Interaktionspartner von Pse1 sind viele Transkriptionsfaktoren, wie z. B. Ste12, Pho4 oder Aft1 bekannt, aber auch Proteine, die in die Ribosomen-Biogenese involviert sind (Tabelle 1) (Schlenstedt *et al.*, 1997; Kaffman *et al.*, 1998; Leslie *et al.*, 2002; Ueta *et al.*, 2003). Die von Pse1 gebundenen NLSs sind generell eher lang und enthalten zumindest eine kurze Folge basischer Aminosäuren, sowie Serin- und Prolinreste (Leslie *et al.*, 2002; Ueta *et al.*, 2003). Die NLS2 von Tec1, die von Pse1 gebunden wird, ist sehr lang und enthält sowohl basische Aminosäuren als auch mehrere Serin- und Prolinreste. Interessanterweise sind die für die NLS2 kritischen Reste K318 und R319 von einem Serin- und einem Prolinrest umgeben (³¹⁷SKRP³²⁰) und die gleiche Sequenz findet man auch in dem ebenfalls von Pse1 gebundenen Transkriptionsfaktor Aft1 (Ueta *et al.*, 2003). Das Protein Nop1 wird sowohl von Pse1 als auch von Kap104 gebunden und Mutation von diesen beiden Karyopherinen ist synthetisch letal (Leslie *et al.*, 2004). Daraus lässt sich schließen, dass die Transportspezifitäten dieser beiden Importine überlappen. Kap104 interagiert mit beiden NLSs von Tec1. Bisher wurden für dieses Karyopherin der Transkriptionsfaktor Tfg2 und mRNA-Bindeproteine als Cargos identifiziert (Lee & Aitchison, 1999; Süel & Chook, 2009). Generell erkennt Kap104 die so genannte PY-NLS (Lee *et al.*, 2006; Lange *et al.*, 2008). Ein solches Motiv ist allerdings in keiner der NLSs von Tec1 zu finden. Daher kann Kap104 wahrscheinlich auch andere NLS-Motive erkennen. Die NLS des Transkriptionsfaktors Tgf2 kann auch von den Importinen Sxm1 und Kap120 erkannt werden, was bedeutet, dass auch zwischen Kap104 und diesen Importinen eine funktionelle Redundanz besteht (Süel & Chook, 2009). Mit Sxm1 interagiert Tec1 nicht, jedoch mit Kap120 über die NLS2. Als Cargos von Kap120 sind bereits verschiedene Transkriptionsfaktoren bekannt (Tabelle 1). Das Importin Kap114 interagiert mit beiden NLSs von Tec1. Auch für dieses Protein sind bereits Transkriptionsfaktoren als Cargos bekannt, z. B. Asr1 und Sua7 (Tabelle 1) (Hodges *et al.*, 2005; Fries *et al.*, 2007). Das Importin Mtr10 zeigt nur Interaktion mit der NLS1 von Tec1. Bisher ist für dieses Karyopherin nur bekannt, dass es mit mRNA-Bindeproteinen interagiert. Schließlich konnte für beide NLSs die Interaktion mit Srp1 (dem Importin α aus Hefe) gezeigt werden. Srp1 bindet normalerweise klassische NLSs. Es wurde jedoch auch schon für nicht-klassische NLSs eine Interaktion mit Srp1 nachgewiesen (Melen *et al.*, 2003; Chen *et al.*, 2005). Srp1 bildet ein Heterodimer mit dem Importin β Kap95 um den Kernimport zu

bewerkstelligen (Enenkel *et al.*, 1995; Görlich *et al.*, 1996). Jedoch kann Tec1 über die NLS2 auch direkt mit Kap95 interagieren. Die Transkriptionsfaktoren Gal4 und Asr1 binden ebenfalls direkt an Kap95 (Chan *et al.*, 1998; Fries *et al.*, 2007).

3.3.2 Wie unterscheiden die Importine zwischen NLS1 und NLS2?

Die Punktmutation R319A stört die Funktion der NLS2 erheblich. Daher wurde das Protein MBP-Tec1^{R319A} in *E. coli* hergestellt, gereinigt und auf seine Interaktion mit den Importinen Mtr10, Kap104 und Pse1 getestet. Interessanterweise konnten alle drei Importine von dem punktmutierten Protein gebunden werden. Da Mtr10 nur mit der NLS1 von Tec1 interagiert, ist hier kein Effekt der Punktmutation in NLS2 zu erwarten. Kap104 interagiert sowohl mit der NLS1 als auch mit der NLS2 von Tec1. MBP-Tec1^{R319A} konnte noch an Kap104 binden, wobei die Interaktion etwas schwächer ist, als mit dem Wildtypprotein. Dies könnte ein Hinweis darauf sein, dass beide NLSs gleichzeitig jeweils ein Kap104-Molekül binden können. Das Importin Pse1 interagiert nur mit der NLS2 von Tec1. Die Punktmutation R319A hat jedoch die Interaktion mit Pse1 nicht beeinträchtigt. Ein Grund dafür könnte sein, dass die Bindung der Mutante an Pse1 zwar geschwächt ist, dies jedoch in dem *in vitro*-Experiment unter den gegebenen Bedingungen nicht feststellbar ist. Durch Wiederholung des Versuchs mit stringenteren Bedingungen könnte dies überprüft werden. Eine andere Möglichkeit, warum Pse1 von dem mutierten Protein noch gebunden werden konnte ist, dass dieses Importin die NLS2 von Tec1 an anderer Stelle bindet bzw. andere Aminosäuren kritisch für die Interaktion sind. Da der Bereich der NLS2 sehr groß ist und die Punktmutation R319A die Funktion der NLS nicht komplett zerstört, wäre eine solche Hypothese möglich. Generell haben die für die beiden NLSs kritischen Aminosäuren wahrscheinlich einen Effekt auf die Bindung der meisten Importine, da sonst durch die Redundanz der Transportrezeptoren keine Auswirkung der Mutationen auf die Kernlokalisierung zu beobachten wäre. Die Importine nutzen daher vermutlich die gleichen oder ähnliche Aminosäuren in den NLSs von Tec1. Eine wichtige Frage ist, wie genau die Importine über NLS1 bzw. NLS2 binden und wie sie zwischen NLS1 und NLS2 unterscheiden können. Durch biochemische Analyse aller bekannten Punktmutanten, die den Kernimport beeinträchtigen, könnte man in Zukunft untersuchen, welche Aminosäuren für die einzelnen Importininteraktionen von Bedeutung sind.

3.3.3 Der Kernimport über verschiedene Importine ist vorteilhaft

Es gibt verschiedene Beispiele für Proteine, die mit mehreren Importinen interagieren. Ribosomale Proteine aus *S. cerevisiae* interagieren sowohl mit Pse1 als auch mit Kap123, solche aus Vertebraten interagieren mit Transportin, Importin β , Importin 5 und Importin 7 (Rout *et al.*, 1997; Jäkel & Görlich, 1998). Für das ribosomale Protein L23a aus *Homo sapiens* konnte darüber hinaus gezeigt werden, dass alle vier Transportrezeptoren das gleiche Kernlokalisierungssignal erkennen (Jäkel & Görlich, 1998). Die Histonproteine H2A und H2B aus *S. cerevisiae* können jeweils mit vier Importinen interagieren, nämlich Kap114, Pse1, Kap123 und Kap95 (Mosammaparast *et al.*, 2001; Greiner *et al.*, 2004). Die gleichen Importine und zusätzlich Kap104 interagieren mit dem Transkriptionsfaktor Asr1 aus *S. cerevisiae* (Fries *et al.*, 2007). Auch für verschiedene Proteine aus Vertebraten wurde beschrieben, dass sie mit mehreren Importinen interagieren, z. B. für den Glukokortikoidrezeptor, der zwei NLSs enthält, die beide von Importin 7 und Importin 8 gebunden werden, eine der NLSs interagiert zusätzlich mit Importin $\alpha 2$ (Freedman & Yamamoto, 2004; Tao *et al.*, 2006). Daraus ergibt sich die Möglichkeit für eine kontextspezifische Regulation des Kernimports (Lin *et al.*, 2009).

Generell ist es von Vorteil, wenn ein Protein über mehrere Karyopherine in den Kern importiert werden kann. Das Protein kann so auch im Fall einer zum Funktionsverlust führenden Mutation eines Importins immer noch in den Kern transportiert werden. Aber auch wenn hohes Transportaufkommen herrscht, z. B. bei schnellem Wachstum oder als Antwort auf Umweltbedingungen, sind mehrere Importrezeptoren von Vorteil für ein bestimmtes Protein (Leslie *et al.*, 2004). Warum gerade der Transkriptionsfaktor Tec1 über ein Netzwerk von mehreren Importinen in den Zellkern transportiert werden kann, ist jedoch nicht direkt ersichtlich, da Tec1 keine essentielle Funktion in der Zelle erfüllt. Der Transkriptionsfaktor Ste12 hingegen, der nicht nur für das filamentöse Wachstum, sondern auch für die Konjugation von Hefezellen notwendig ist, enthält vermutlich nur eine NLS und interagiert lediglich mit dem Importin Pse1 (Leslie *et al.*, 2002).

3.4 Modell für den Kernimport von Tec1

Anhand der in dieser Arbeit präsentierten Daten und Informationen aus anderen Studien kann ein Modell für den Kernimport des TEAD-Transkriptionsfaktors Tec1 aufgestellt werden: Unter Umweltbedingungen, die das filamentöse Wachstum von Hefezellen induzieren, wird die Expression des *TEC1*-Gens aktiviert. Die synthetisierten mRNA-Moleküle werden aktiv aus dem Zellkern exportiert und dort von freien Ribosomen translatiert. Die Tec1-Moleküle können im Zytoplasma mit verschiedenen Proteinen interagieren. Sehr wahrscheinlich werden die Tec1-Proteine sofort in den Zellkern transportiert. Dafür sind theoretisch viele verschiedene Varianten möglich (Abb. 3.5).

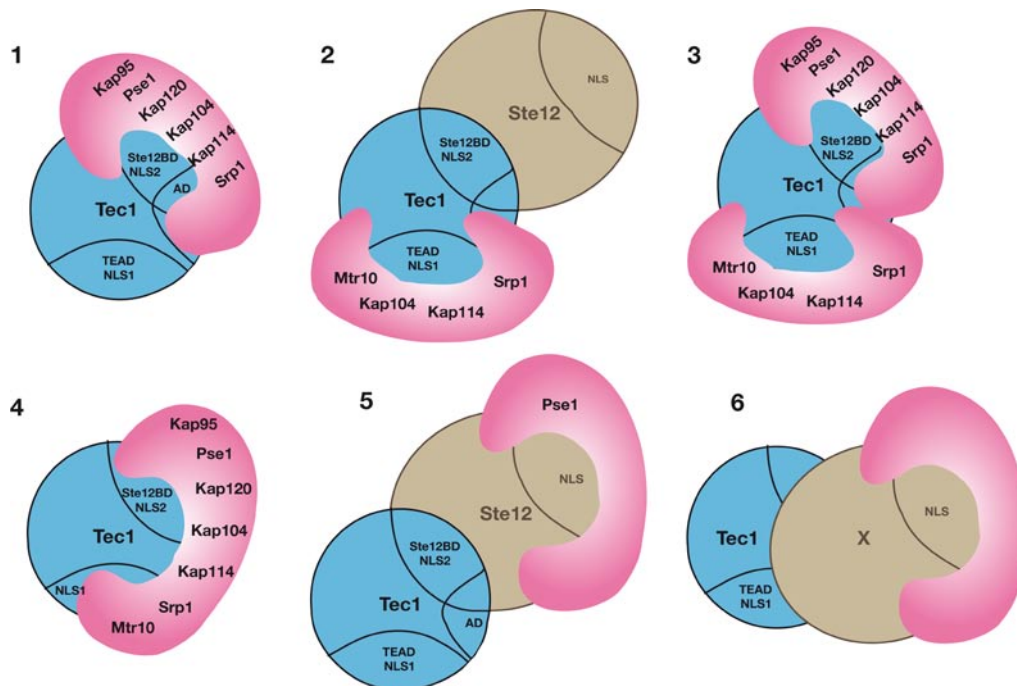


Abb. 3.5: Varianten des Kernimports des Transkriptionsfaktors Tec1. 1. Die NLS2 wird von Kap95, Pse1, Kap120, Kap104, Kap114 oder Srp1 gebunden; 2. die NLS1 wird von Mtr10, Kap104, Kap114 oder Srp1 und gegebenenfalls gleichzeitig von Ste12 gebunden; 3. NLS1 und NLS2 sind jeweils von einem der mit diesen Bereichen interagierenden Importine gebunden; 4: Kap95, Pse1, Kap120, Kap104, Kap114, Srp1 oder Mtr10 bindet gleichzeitig an NLS1 und NLS2; 5. Tec1 wird von Ste12 gebunden, das wiederum Pse1 gebunden hat; 6. Tec1 wird von einem anderen Interaktionspartner (X), der kein Importin ist, über einen Huckepack-Mechanismus in den Kern transportiert.

Mit welcher Wahrscheinlichkeit die verschiedenen Möglichkeiten des Kernimports von Tec1 auftreten, hängt einerseits von der relativen Anzahl der Importine und ihrer Cargos ab und andererseits von den Bindeaffinitäten der Cargos zu ihren Interaktionspartnern. Die Anzahl der Moleküle vieler Proteine in *S. cerevisiae*-Zellen wurde bestimmt (Ghaemmaghami *et al.*, 2003). Dieser Studie zufolge liegen 530 Tec1-Moleküle und 1920 Ste12-Moleküle in der Zelle vor. Die Karyopherine Srp1, Kap104 und Kap114

sind jeweils mit 2000–3000 Molekülen pro Zelle vertreten, Mtr10 und Kap120 liegen in 6000- bis 7000-facher Kopie vor, von Pse1 sind ca. 16000 und von Kap95 ca. 52000 Moleküle vorhanden (Ghaemmaghami *et al.*, 2003). Die NLS2 von Tec1 kann mit sechs verschiedenen Importinen interagieren, NLS1 nur mit vier. Darüber hinaus sind zwei der mit der NLS2 interagierenden Importine, nämlich Kap95 und Pse1, in hoher Kopiezahl in der Zelle vorhanden (Abb. 3.6). In Hefezellen, in denen Kap95 als temperatursensitive Variante vorliegt, lokalisierte GFP-Tec1^{AS 301–400} schwächer im Zellkern als in einem Wildtypstamm. Dies deutet darauf hin, dass dieses abundante Importin von großer Bedeutung für den Import von Tec1 über die NLS2 sein könnte. Demnach ist die Wahrscheinlichkeit, dass die NLS2 von Kap95 gebunden wird, sehr hoch (Abb. 3.5, Nr. 1). Es wurde auch beobachtet, dass das Tec1-Fragment, das die NLS2 enthält, stärker im Kern lokalisiert, als das mit der NLS1. Dies ist vermutlich darauf zurückzuführen, dass die NLS2 von mehreren verschiedenen Importinen erkannt wird, die zum Teil in sehr hoher Kopiezahl in der Zelle vorliegen, während die NLS1 von vier Importinen gebunden wird, die in geringerer Molekülzahl vorliegen (Abb. 3.6). Eine Analyse der Bindeaffinitäten der Importin-Tec1 Interaktionen ist jedoch notwendig, um die Hypothese zu überprüfen, da in der Zelle niedriger konzentrierte Karyopherine, die eine hohe Affinität zu der NLS1 bzw. NLS2 haben, eine große Rolle beim Kernimport spielen würden. Es wäre auch interessant herauszufinden, ob die Affinität von Ste12 zu der Ste12-Bindedomäne/NLS2 im Zytoplasma anders ist als im Zellkern bzw. ob sie stärker oder schwächer als die Affinität zu den Importinen ist.

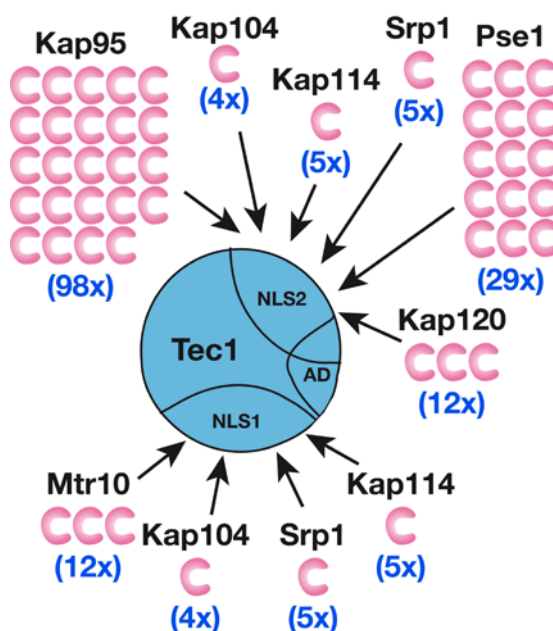


Abb. 3.6: Relative Molekülzahl von Tec1 und dessen Importinen in der Zelle. Schematische Darstellung von Tec1 mit NLS1 und NLS2, sowie der Aktivierungsdomäne (AD) und der relativen Molekülzahl der mit NLS1 bzw. NLS2 interagierenden Importine. Die Größenverhältnisse der Moleküle sind nicht proportional. Die Zahlen in blauer Schrift geben das Mengenverhältnis der Importinmoleküle zu Tec1 an.

Da im Zytoplasma exponierte DNA-Bindedomänen dazu neigen, mit anderen Molekülen zu aggregieren, ist es für die Zelle oft notwendig, diese Bereiche abzuschirmen (Jäkel & Görlich, 1998; Jäkel *et al.*, 1999). Eine Möglichkeit dafür ist die Interaktion eines Importins mit der in der DNA-Bindedomäne liegenden NLS (Abb. 3.5, Nr. 2). Es ist auch gut möglich, dass sowohl NLS1 als auch NLS2 jeweils von einem Importin gebunden werden und dieser trimere Komplex durch die Kernporen transportiert wird (Abb. 3.5, Nr. 3).

Theoretisch ist auch denkbar, dass ein und dasselbe Importinmolekül beide NLSs von Tec1 gleichzeitig bindet (Abb. 3.5, Nr. 4). Dazu müssten die beiden NLS-Bereiche von Tec1 räumlich so nah beieinander liegen, dass das C-förmige Importin mit beiden Regionen interagieren kann. Bei den *in vitro*-Interaktionsstudien dieser Arbeit zeigte sich, dass die Importine Mtr10, Kap104 und Kap120 etwas schwächer mit den kurzen NLS1- bzw. NLS2-Fragmenten von Tec1 interagierten, als mit dem Gesamtprotein. Da Mtr10 nur mit der NLS1 und Kap120 nur mit der NLS2 interagiert, könnte dies ein Hinweis darauf sein, dass diese Karyopherine beide NLSs auch gleichzeitig erkennen und binden könnten.

Tec1 interagiert vermutlich bereits im Zytoplasma mit verschiedenen Proteinen, daher ist es auch möglich, dass es über einen Huckepack-Mechanismus mit einem seiner Interaktionspartner in den Zellkern ko-importiert wird. In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass die mit Tec1 interagierenden Proteine Ste12, Fus3 und Nis1 nicht für den Kernimport via NLS1 oder NLS2 notwendig sind, auch die Kinase Kss1, die nicht direkt mit Tec1 interagiert ist nicht für dessen Import notwendig. Es ist aber dennoch möglich, dass diese Proteine den Kernimport von Tec1 vermitteln können – zusätzlich zu den direkten Importmechanismen (Abb. 3.5, Nr. 5 und Nr. 6).

Bisher wurde nur für sehr wenige Proteine ein Huckepack-Mechanismus für den Kernimport beschrieben und dann auch oft als zusätzliche Möglichkeit neben einem direkten Transport über Importine. Ein Beispiel ist das Protein Sof1, das für die Biogenese der kleinen ribosomalen Untereinheit essentiell ist. Sof1 enthält eine NLS und interagiert mit dem Importin Pse1 (Leslie *et al.*, 2004). Vermutlich wird es jedoch eher im Komplex mit Nop1 in den Kern transportiert, welches ebenfalls mit Pse1 interagiert. Da Sof1 und Nop1 nicht gleichzeitig mit ihren NLSs an Pse1 binden können und die Interaktion zwischen Nop1 und Pse1 stärker ist als die zwischen Sof1 und Pse1, wird vermutet, dass die NLS1 von Nop1 für den Import des trimeren Komplexes

genutzt wird und somit Sof1 über einen Huckepack-Mechanismus transportiert wird (Leslie *et al.*, 2004).

Der direkte Import von Proteinen in den Zellkern durch Interaktion mit Transportrezeptoren ist jedoch effizienter und schneller, zumal große Proteinkomplexe die Kernporenkomplexe wahrscheinlich schlechter passieren können, als dimere Komplexe aus Karyopherin und Cargo.

Interessanterweise interagieren sowohl Ste12 als auch Tec1 mit dem Importin Pse1. Für Ste12 wurde Pse1 bisher als einziges Transportprotein identifiziert (Leslie *et al.*, 2002). Die NLS2 von Tec1, die auch gleichzeitig für die Interaktion mit Ste12 notwendig ist, bindet ebenfalls Pse1. Da die beiden Domänen vollständig überlappen ist es sehr unwahrscheinlich, dass Tec1 gleichzeitig an Pse1 und an Ste12 binden kann. Ste12 kann aber vermutlich simultan an Tec1 und Pse1 binden, da die Interaktionsflächen voneinander getrennt sind.

Tec1 kann also über verschiedene Varianten in den Zellkern transportiert werden. Dort wird die Interaktion mit den Importinen durch Gsp1GTP gelöst und Tec1 kann dann sowohl an Ste12 binden (sofern das noch nicht geschehen ist) als auch mit den TCS-Elementen in der DNA interagieren. Letzteres dient vermutlich auch dazu, dass Tec1 im Kern gehalten wird. Für einen aktiven Export von Tec1 gibt es bisher keine Hinweise.

3.5 Es gibt bisher keine Hinweise darauf, dass die Kernlokalisierung von Tec1 reguliert ist

Es gibt eine Reihe von Proteinen, deren Kernlokalisierung durch gesteuerten Kernimport oder -export reguliert ist. Bei Transkriptionsfaktoren und Kinasen kann die differenzielle Lokalisierung dazu dienen, als Antwort auf extra- oder intrazelluläre Signale zu reagieren. So wird z. B. der Transkriptionsfaktor Pho4 aus *S. cerevisiae* nur bei Phosphatmangel in den Zellkern transportiert, um dort Gene zu aktivieren, deren Proteine unter diesen Bedingungen für den Phosphatstoffwechsel gebraucht werden (Kaffman *et al.*, 1998). Auch für Proteine, die am filamentösen Wachstum von Hefezellen beteiligt sind, ist eine Regulation des Kerntransportes bekannt. Eine Studie zeigte, dass die Proteinkinasen Bcy1, Fus3, Ksp1, Kss1, Sks1 und Tpk2 unter vegetativen Bedingungen über die Zelle verteilt lokalisiert sind, aber bei filamentösem Wachstum der Zellen in den Zellkern transportiert werden (Bharucha *et al.*, 2008).

Darüber hinaus ist der Kerntransport dieser Kinasen teilweise miteinander vernetzt, so dass z. B. die Phosphorylierung von Fus3 erforderlich ist, damit Ksp1 und Sks1 in den Zellkern importiert werden (Bharucha *et al.*, 2008). Für die Transkriptionsfaktoren Tec1 und Ste12 ist bisher keine differenzielle Lokalisierung bekannt. In dieser Arbeit wurden keine Untersuchungen zur Lokalisierung von Tec1 unter verschiedenen Bedingungen durchgeführt. Da der Kernimport der MAP-Kinase Kss1, welche an der Aktivierung des filamentösen Wachstums beteiligt ist, reguliert ist, ist es eher unwahrscheinlich, dass auch Ste12 und Tec1 einem regulierten Kernimport unterliegen. Sie werden vermutlich konstitutiv in den Kern importiert und dort von der MAP-Kinase Kss1 aktiviert. In Gegenwart des Antibiotikums Rapamycin, welches den TORK1 (Target of Rapamycin-Komplex 1) hemmt und somit Stickstoffmangelbedingungen simuliert (Heitman *et al.*, 1991), lokalisiert Tec1 unverändert im Zellkern (Brückner, 2007). Weiterhin wurde gezeigt, dass Tec1 bei osmotischem Stress (1 M NaCl) nicht aus dem Kern exportiert wird (Shock *et al.*, 2009). Unter diesen Bedingungen werden die MAP-Kinasen Ste7 und Ste12 phosphoryliert, jedoch wird dadurch nicht das filamentöse Wachstum induziert, denn die Bindung von Tec1 an die DNA wird verhindert (Shock *et al.*, 2009). Daher wurde von den Autoren Shock *et al.* untersucht, ob Tec1 unter hochosmotischen Bedingungen aus dem Kern exportiert wird. Jedoch wurde nach nur 10-minütiger Inkubation bei 1 M NaCl die Lokalisierung überprüft und nicht nach längerer Zeit. Somit kann keine Aussage getroffen werden, ob der Import von Tec1 in den Zellkern unter diesen Bedingungen gehemmt ist. Diese Möglichkeit wäre also denkbar, denn dass Tec1 nicht mehr an die DNA binden kann wurde nur indirekt über Chromatin-Immunpräzipitation gezeigt (Shock *et al.*, 2009).

In dieser Arbeit wurde die Interaktion von MBP-Tec1 mit den Exportinen Cse1 und Crm1, sowie mit dem Transportin Msn5 in Gegenwart von Gsp1GTP überprüft, welches im Allgemeinen für diese Interaktionen benötigt wird. Cse1, Crm1 und Msn5 zeigten keine Interaktion mit Tec1, das Exportin Los1 wurde in dieser Arbeit nicht untersucht. Durch Sequenzvergleich konnte in Tec1 auch kein Kernexportsignal (NES) identifiziert werden. Zusammenfassend ist damit ein regulierter Kernexport von Tec1 sehr unwahrscheinlich.

3.6 Tec1 bzw. Tec1-Fragmente lokalisieren teilweise in perinukleären Foci, deren Funktion unklar bleibt

Im Laufe der vorliegenden Arbeit wurde bei verschiedenen GFP-Tec1-Fusionsproteinen eine punktuelle Lokalisierung beobachtet. Die an GFP fusionierte TEA-Domäne von Tec1 (GFP-Tec1^{AS 125–199}) lokalisiert vollständig in einem kleinen Punkt an der Peripherie des Zellkerns. Verschiedene Punktmutanten von GFP-Tec1 zeigen zusätzlich zu der Kernlokalisierung in 40 % der Zellen eine fokale Lokalisierung am Rand des Zellkerns und in sehr seltenen Fällen ist dies auch bei wildtypischem GFP-Tec1 zu beobachten.

Da Hefezellen verhältnismäßig klein sind, sieht man viele kleine Strukturen der Zelle nur als punktuell Signal im (Fluoreszenz-)Mikroskop. Dies macht es schwierig, die Identität der fokalen Signale zu bestimmen. Für GFP-Tec1^{AS 125–199} konnte gezeigt werden, dass es nicht direkt mit dem Signal von GFP-Tec1 überlappt, sondern in den meisten Zellen direkt danebenliegt. Durch Kolokalisierungsanalysen konnte gezeigt werden, dass das punktuelle Signal nicht im Nukleolus liegt, der meistens am Rand des Kerns liegt und auch nicht mit dem Spindelpolkkörper kolokalisiert. Gene, deren Expression aktiviert wird, werden oft in die Nähe der Kernporenkomplexe gebracht (Taddei, 2007). Daher ist es möglich, dass das punktuelle Signal von GFP-Tec1^{AS 125–199}, aber auch der (mutierten) GFP-Tec1-Proteine, durch Anhäufung von Genen mit TCS-Elementen in den Promotorregionen an der Kernperipherie zustande kommt. Die Lokalisierung von GFP-Tec1^{AS 125–199} wurde in diploiden Hefezellen überprüft. Auch in Zellen mit doppeltem Chromosomensatz war nur ein punktuell Signal zu sehen. Hätte man zwei Signale an der Kernperipherie gesehen, hätte dies dafür gesprochen, dass die fokale Lokalisierung auf TCS-Bindung zurückzuführen ist. Da dies nicht zu beobachten war, gibt es bisher keine Belege für die Hypothese.

In Hefezellen wurde eine als JUNQ (juxtannuclear quality control; juxtannukleäre Qualitätskontrolle) bezeichnete Region beschrieben, die wie der Name schon sagt, direkt neben dem Zellkern zu finden ist (Kaganovich *et al.*, 2008). In diesem Bereich der Zelle akkumulieren ubiquitinierte, missgefaltete Proteine (Kaganovich *et al.*, 2008). Da die punktuellen Signale der verschiedenen GFP-Tec1-Proteine ebenfalls an der Kernperipherie zu finden sind und die Größe der JUNQ-Region vergleichbar mit den fokalen GFP-Tec1-Signalen ist, besteht die Möglichkeit, dass die GFP-Tec1^{AS 125–199} - Moleküle stark fehlgefaltet sind und daher in diesen Bereich der Zelle gebracht werden. Die partielle punktuelle Lokalisierung von wildtypischem bzw. mutiertem GFP-Tec1

könnte darauf zurückzuführen sein, dass diese Proteine durch die Mutation bzw. unter Stressbedingungen eine Erhöhte Neigung zur Fehlfaltung haben und daher teilweise in der JUNQ-Region lokalisieren (Kaganovich *et al.*, 2008).

3.7 Ausblick

Anhand der Ergebnisse der in dieser Arbeit durchgeführten Experimente konnten verschiedene Hypothesen aufgestellt werden, die in nachfolgenden Studien überprüft werden könnten. Es wäre z. B. interessant zu testen, ob die TEA-Domänen von anderen Transkriptionsfaktoren dieser Familie auch hinreichend für die Kernlokalisierung sind und ob diese Proteine ebenfalls eine weitere, effizientere NLS enthalten. Bezüglich Tec1 wäre es besonders interessant zu untersuchen, wie die verschiedenen Importine zwischen den beiden NLSs unterscheiden können und warum manche an beide NLSs binden können. Am aufschlussreichsten wäre sicher eine Kokristallisation verschiedener Importine mit Tec1 bzw. den NLS-enthaltenden Fragmenten, um die genaue Interaktion der Moleküle zu bestimmen. Alternativ könnte man die Interaktion der verschiedenen Tec1-Mutanten, deren Kerntransport beeinträchtigt ist, mit den einzelnen Importinen untersuchen, um mögliche Unterschiede in den Kontraktstellen zu erkennen. Ebenso wäre es interessant die Bindeaffinitäten von Ste12 bzw. den mit der NLS2 interagierenden Importine zu untersuchen, da die NLS2 mit der Ste12-Bindedomäne überlappt. Hier könnte man Kompetitionsanalysen durchführen um herauszufinden, ob es Unterschiede im Bindeverhalten gibt und mit welcher Wahrscheinlichkeit die verschiedenen Proteine miteinander interagieren. Die Interaktion von Tec1 mit der DNA, weiteren Transkriptionsfaktoren und den hier gefundenen Importinen, könnte zudem durch Umweltbedingungen gesteuert sein. Obwohl in dieser Arbeit keine direkten Hinweise dafür gefunden wurden, wären solche Untersuchungen in Zukunft sicher interessant. Schließlich könnte man überprüfen, ob die in dieser Arbeit bei verschiedenen GFP-Tec1-Fusionsproteinen beobachteten perinukleären Foci durch Akkumulation von fehlgefalteten Proteinen im JUNQ-Bereich zustande kommen. Dazu könnte man die fokalen Foci mit Proteinen kolokalisieren, von denen bekannt ist, dass sie unter bestimmten Bedingungen im JUNQ lokalisieren, wie z. B. das Chaperon Hsp104 (Kaganovich *et al.*, 2008). Auch hier wäre zu überprüfen, ob es sich dabei um einen regulierten Prozess handeln könnte.

4. Material

4.1 Geräte

Tabelle 6: Geräte

Gerät	Firma
DNA-Gelelektrophoreseapparaturen	Elektronikwerkstatt der Philipps-Universität Marburg
Geldokumentationsanlage	BIORAD INDUSTRIES GMBH (München, D)
Fluoreszenzmikroskop „Axio Imager A1“	CARL ZEISS AG (Oberkochen, D)
Fluoreszenzmikroskop „Axiovert 200M“	CARL ZEISS AG (Oberkochen, D)
CCD-Kamera „1394 ORCA-ERA“	HAMAMATSU PHOTONICS K. K. (Herrsching am Ammersee, D)
Konfokales Laser Scanning Mikroskop „Leica TCS SP5“	LEICA MIKROSYSTEME GMBH (Wetzlar, D)
PCR-Maschinen „Primus 25 advanced“ und „Primus 96 advanced“	PEQLAB BIOTECHNOLOGIE GMBH (Erlangen, D)
Spektralphotometer „Biowave CO8000“	BIOCHROM LTD. (Cambridge, GB)
SDS-Gelelektrophoreseapparatur „Mini PROTEAN“	BIORAD INDUSTRIES GMBH (München, D)
Tischzentrifugen „Biofuge pico“ und „Biofuge fresco“	THERMO FISHER SCIENTIFIC INC. (Waltham, MA, USA)
Röhrenzentrifuge „Sigma 4K15“	SIGMA LABORZENTRIFUGEN GMBH (Osterode am Harz, D)
Intas ChemoCam HR Imager	INTAS SCIENCE IMAGING INSTRUMENTS GMBH (Göttingen, D)
„TyphoonTM Variable Mode Imager 9400“	GE HEALTHCARE (München, D)
Kamera „Canon Power Shot A620“	CANON DEUTSCHLAND GMBH (Krefeld, D)
Spektralphotometer “NanoDrop® ND1000”	PEQLAB BIOTECHNOLOGIE GMBH (Erlangen, D)
Mikrotiterplatten-Lesegerät “Model 680”	BIORAD INDUSTRIES GMBH (München, D)
Spannungsgeber für Elektrophorese	BIORAD INDUSTRIES GMBH (München, D)
Ultrazentrifuge L7-65	BECKMAN COULTER INC. (Brea, CA, USA)
AMINCO French Press	AMERICAN INSTRUMENT EXCHANGE INC. (Haverhill, MA, USA)

4.2 Chemikalien

Chemikalien zur Herstellung von Lösungen, Puffern und Medien wurden von den Firmen MERCK KGAA (Darmstadt, D), ROCHE GMBH (Mannheim, D), CARL ROTH GMBH & Co KG (Karlsruhe, D), INVITROGEN GMBH (Karlsruhe, D), GE HEALTHCARE (München, D) und SIGMA-ALDRICH CHEMIE GMBH (Steinheim, D) bezogen.

4.3 Enzyme, Größenstandards und Kits

Tabelle 7: Enzyme, Größenstandards und Kits

Restriktionsendonukleasen	FERMENTAS GMBH (St. Leon-Rot, D), NEW ENGLAND BIOLABS (Ipswich, MA, USA),
Phusion Polymerase	FINNZYMES OY (Espoo, FI)
KOD Polymerase	MERCK KGAA (Darmstadt, D)
Taq Polymerase	FERMENTAS GMBH (St. Leon-Rot, D)
Pfu Polymerase	FERMENTAS GMBH (St. Leon-Rot, D)
T4 DNA-Ligase	ROCHE GMBH (Mannheim, D)
DNA-Größenstandard „GeneRuler™ DNA-Ladder Mix“	FERMENTAS GMBH (St. Leon-Rot, D)
Plasmid-DNA Mini-Präparationskit	METABION GMBH (Martinsried, D), QIAGEN GMBH (Hilden, D)
Gel-Extraktions-Kit („E.Z.N.A. Gel extraction kit“)	VWR INTERNATIONAL GMBH (Darmstadt, D)
Protein Größenstandard „Prestained Protein Molecular Weight Marker“	FERMENTAS GMBH (St. Leon-Rot, D)

4.4 Auftragsarbeiten

Sequenzierungen wurden von SEQUENCE LABORATORIES GMBH (Göttingen, D) und QIAGEN GMBH (Hilden, D) durchgeführt. Synthetische Oligonukleotide wurden bei METABION GMBH (Martinsried, D) in Auftrag gegeben.

4.5 Verwendete Antikörper

Tabelle 8: Antikörper

Antikörper	Herkunft	Verdünnung	Bemerkung	Hersteller, Bestellnummer
Cdc28	Ziege	1:2000	polyklonal	SANTA CRUZ BIOTECHNOLOGY INC. (Santa Cruz, CA, USA), sc-6709
GFP	Maus	1:3000	monoklonal	SANTA CRUZ BIOTECHNOLOGY INC. (Santa Cruz, CA, USA), sc-9996
GST	Kaninchen	1:2000	polyklonal	SANTA CRUZ BIOTECHNOLOGY INC. (Santa Cruz, CA, USA), sc-459
MBP	Maus	1:10000	monoklonal	SIGMA-ALDRICH CHEMIE GMBH (Steinheim, D), E8032S
HA	Maus	1:1000	monoklonal	SIGMA-ALDRICH CHEMIE GMBH (Steinheim, D), H3663
Kaninchen IgG	Ziege	1:5000	Peroxidase-gekoppelt	SANTA CRUZ BIOTECHNOLOGY INC. (Santa Cruz, CA, USA), sc-2054
Ziege IgG	Esel	1:5000	Peroxidase-gekoppelt	SANTA CRUZ BIOTECHNOLOGY INC. (Santa Cruz, CA, USA), sc-2020
Maus IgG	Ziege	1:5000	Peroxidase-gekoppelt	JACKSON IMMUNO RESEARCH LTD. (Suffolk, GB), 115-035-003

4.6 Verwendete Stämme und Plasmide

4.6.1 *Escherichia coli*-Stämme

Tabelle 9: *Escherichia coli*-Stämme

Stamm	Genotyp	Referenz
BL21Codon plus (DE3)-RIL (Codon plus)	B F ⁻ ompT hsdS(r _B ⁻ m _B ⁻) dcm ⁺ Tet ^R gal λ(DE3) endA Hte [argU ileY leuW Cam ^R]	AGILENT TECHNOLOGIES INC. (Santa Clara, CA, USA)
KRX	[F', traD36, ΔompP, proA ⁺ B ⁺ , lacI ^q , Δ(lacZ)M15] ΔompT, endA1, recA1, gyrA96 (Nal ^r), thi-1, hsdR17 (r _K ⁻ , m _K ⁺), e14 ⁻ (McrA ⁻), relA1, supE44, Δ(lac-proAB), Δ(rhaBAD)::T7 RNA polymerase	Hartnett <i>et al.</i> , 2006, PROMEGA CORPORATION (Madison, WI, USA)
TOP10	F ⁻ mcrA Δ(mrr-hsdRMS-mcrBC) φ80lacZΔM15 ΔlacX74 recA1 araD139 Δ(ara-leu) 7697 galU galK rpsL (Str ^R) endA1 nupG	INVITROGEN GMBH (Karlsruhe, D)

4.6.2 *Saccharomyces cerevisiae*-Stämme

Tabelle 10: *Saccharomyces cerevisiae*-Stämme

Stamm	Genotyp	Referenz
YCT 901	<i>MATa/α, SPC42-eqFP611::kanMX/SPC42-eqFP611::kanMX, SK1</i>	Stammsammlung Christof Taxis
YHUM 0257	<i>MATa/α, ura3-52/ura3/52, Σ1278b</i>	Stammsammlung AG Mösch
YHUM 0610	<i>MATa, tec1::HIS3, ura3-52, his3::hisG, leu2::hisG, trp1::hisG, Σ1278b</i>	Stammsammlung AG Mösch
YHUM 0677	<i>MATa, ura3-52, leu2::hisG, his3::hisG, trp1::hisG, kss1::hisG, Σ1278b</i>	Madhani & Fink, 1997
YHUM 0678	<i>MATa, ura3-52, leu2::hisG, his3::hisG, trp1::hisG, fus3::TRP1, Σ1278b</i>	Madhani & Fink, 1997
YHUM 0679	<i>MATa, ura3-52, leu2::hisG, his3::hisG, trp1::hisG, kss1::hisG, fus3::TRP1, Σ1278b</i>	Madhani & Fink, 1997
YHUM 0792	<i>MATa, ura3-52, LEU2, his3::hisG, TRP1, tec1Δ::HIS3, Σ1278b</i>	Stammsammlung AG Mösch
YHUM 0899	<i>MATa, ura3-52, leu2::hisG, his3::hisG, trp1::hisG, nis1Δ::kanMX4, Σ1278b</i>	Brückner, 2002
YHUM 0930	<i>MATa, ura3-52, ste12Δ, Σ1278b</i>	Stammsammlung AG Mösch
YHUM 0956	<i>MATa, ura3-52, S288c</i>	Stammsammlung AG Mösch
YHUM 1035	<i>MAT α, mtr10::HIS3, ade2, leu2, trp1, his3, ura3, W303</i>	Pemberton <i>et al.</i> , 1997
YHUM 1036	<i>MATa, kap104::HIS3, ura3, his3, trp1, leu2, lys2, W303</i>	Aitchison <i>et al.</i> , 1996
YHUM 1037	<i>MATa, pse1-1, ura3, trp1, leu2, W303</i>	Seedorf & Silver, 1997
YHUM 1038	<i>MATα, rsl1-4 (kap95ts), ura3, trp1, leu2, ade2, W303</i>	Koepp <i>et al.</i> , 1996
YHUM 1040	<i>MATα, srp1-31, ade2, ura3, trp1, leu2, W303</i>	Lehmann <i>et al.</i> , 2002
YHUM 1041	<i>MATa, ade2, trp1, leu2, his3, ura3, W303</i>	Nasmyth <i>et al.</i> , 1990
YHUM 1043	<i>MATα, kap123::HIS3, ura3, his3, leu2, W303</i>	Seedorf & Silver, 1997
YHUM 1044	<i>MATα, nmd5::HIS3, ade2, ura3, his3, leu2, ade8, W303</i>	Ferrigno <i>et al.</i> , 1998
YHUM 1045	<i>MATa, pdr6::HIS3, ura3, his3, trp1, leu2, W303</i>	Lau <i>et al.</i> , 2000
YHUM 1046	<i>MATa, sxm1::HIS3, ura3, his3, trp1, leu2, W303</i>	Seedorf & Silver, 1997

Fortsetzung Tabelle 10:

Stamm	Genotyp	Referenz
YHUM 1047	<i>MATa, kap114::HIS3, ura3, his3, trp1, leu2, lys2, W303</i>	Pemberton <i>et al.</i> , 1999
YHUM 1363	<i>MATa, trp1::hisG, leu2::hisG, tec1Δ::HIS3, TCS-CYC1-lacZ::URA3, Σ1278b</i>	Köhler <i>et al.</i> , 2002
YHUM 1889	<i>MATa, tec1Δ::HIS3, NUP49::tagRFP::kanMX, his3::hisG, TRP1, ura3-52, LEU2, Σ1278b</i>	diese Arbeit
YHUM 1946	<i>MATa, ura3::GAL1(P)-p14^{D122Y}-TEV²³⁴Stopp::kanMX::ura3, ura3-52, his3::hisG, leu2::hisG, Σ1278b</i>	Renicke, 2010
YHUM 1976	<i>MATa, ura3::GAL1(P)-p14^{D122Y}-TEV²³⁴Stopp::kanMX::ura3, tTA, NatNT2, tetO₇(P)-yeGFP-TDegF-2HA::PSE1, ura3-52, his3::hisG, leu2::hisG, Σ1278b</i>	diese Arbeit

4.6.3 Plasmide

Tabelle 11: Plasmide

Plasmid	Genotyp	Referenz
B2439	<i>CEN, LEU2, bla, (YCplac111)</i>	Stammsammlung AG Mösch
BHUM 0388	<i>MBP::TEC1::FLAG, bla, (pMALc2)</i>	Madhani & Fink, 1997
BHUM 0390	<i>pMALc2, bla</i>	NEW ENGLAND BIOLABS (Ipswich, MA, USA)
BHUM 0570	<i>TEC1(P)::GFPuv::TEC1(t); 2μm, URA3, bla</i>	Wesche, 2000
BHUM 0697	<i>TEC1(P)::TEC1, CEN, LEU2, bla</i>	Stammsammlung AG Mösch
BHUM 1156	<i>TEC1(P)::GFPuv::TEC1(t); 2μm, URA3, bla</i>	diese Arbeit
BHUM 1196	<i>TEC1(P)::GFPuv::TEC1::TEC1(t); 2μm, URA3, bla</i>	Drabig, 2007
BHUM 1197	<i>TEC1(P)::GFPuv::TEC1^{AS 1-240}::TEC1(t), 2μm, URA3, bla</i>	Drabig, 2007
BHUM 1198	<i>TEC1(P)::GFPuv::TEC1^{AS 241-485}::TEC1(t), 2μm, URA3, bla</i>	Drabig, 2007
BHUM 1199	<i>TEC1(P)::GFPuv::TEC1^{AS 1-122}::TEC1(t), 2μm, URA3, bla</i>	Drabig, 2007
BHUM 1200	<i>TEC1(P)::GFPuv::TEC1^{AS 110-270}::TEC1(t), 2μm, URA3, bla</i>	Drabig, 2007

Fortsetzung Tabelle 11:

Plasmid	Genotyp	Referenz
BHUM 1201	<i>TEC1(P)::GFPuv::TEC1^{AS 253–412}::TEC1(t)</i> , 2 μ m, URA3, <i>bla</i>	Drabig, 2007
BHUM 1202	<i>TEC1(P)::GFPuv::TEC1^{AS 395–485}::TEC1(t)</i> , 2 μ m, URA3, <i>bla</i>	Drabig, 2007
BHUM 1217	<i>TEC1(P)::GFPuv:: TEC1^{AS 125–199}::TEC1(t)</i> , 2 μ m, URA3, <i>bla</i>	diese Arbeit
BHUM 1220	<i>GAL1(P)::GFP::TEC1^{AS 191–270}</i> , CEN, URA3, <i>bla</i>	diese Arbeit
BHUM 1222	<i>TEC1(P)::GFP:: TEC1^{AS 301–412}::TEC1(t)</i> 2 μ m, URA3, <i>bla</i>	diese Arbeit
BHUM 1224	<i>TEC1(P)::GFPuv:: TEC1^{AS 253–332}::TEC1(t)</i> , 2 μ m, URA3, <i>bla</i>	diese Arbeit
BHUM 1225	<i>Tec1(P)::GFPuv:: TEC1^{AS 333–412}::TEC1(t)</i> ; 2 μ m, URA3, <i>bla</i>	diese Arbeit
BHUM 1225	<i>TEC1(P)::GFPuv:: TEC1^{AS 333–412}::TEC1(t)</i> , 2 μ m, URA3, <i>bla</i>	diese Arbeit
BHUM 1226	<i>Tec1(P)::GFPuv::TEC1^{AS 344–373}::TEC1(t)</i> ; 2 μ m, URA3, <i>bla</i>	diese Arbeit
BHUM 1227	<i>His₆-GSP1^{Q71L}</i> , <i>bla</i> , (pQE9)	Maurer <i>et al.</i> , 2001
BHUM 1228	<i>GST-TEV-MTR10</i> , <i>bla</i> , pBRori, (pGEX4T)	Caesar <i>et al.</i> , 2006
BHUM 1229	<i>GST-TEV-KAP104</i> , <i>bla</i> , pBRori, (pGEX4T)	Maurer <i>et al.</i> , 2001
BHUM 1230	<i>GST-TEV-PSE1</i> , <i>bla</i> , pBRori, (pGEX4T)	Fries <i>et al.</i> , 2007
BHUM 1231	<i>GST-TEV-KAP95</i> , <i>bla</i> , pBRori, (pGEX4T)	Maurer <i>et al.</i> , 2001
BHUM 1232	<i>GST-SRP1</i> , <i>bla</i> , pBRori, (pGEX4T)	Solsbacher <i>et al.</i> , 1998
BHUM 1233	<i>GST-TEV-KAP123</i> , <i>bla</i> , pBRori, (pGEX4T)	Fries <i>et al.</i> , 2007
BHUM 1234	<i>GST-NMD5</i> , <i>bla</i> , pBRori, (pGEX4T)	Caesar <i>et al.</i> , 2006
BHUM 1235	<i>GST-PDR6</i> , <i>bla</i> , pBRori, (pGEX4T)	Caesar <i>et al.</i> , 2006
BHUM 1236	<i>GST-SXM1</i> , <i>bla</i> , pBRori, (pGEX4T)	Caesar <i>et al.</i> , 2006
BHUM 1237	<i>GST-KAP114</i> , <i>bla</i> , pBRori, (pGEX4T)	Caesar <i>et al.</i> , 2006
BHUM 1238	<i>GST-KAP120</i> , <i>bla</i> , pBRori, (pGEX5G)	Caesar <i>et al.</i> , 2006
BHUM 1239	<i>GST-MSN5</i> , <i>bla</i> , pBRori, (pGEX4T)	Caesar <i>et al.</i> , 2006

Fortsetzung Tabelle 11:

Plasmid	Genotyp	Referenz
BHUM 1240	<i>GST-CSE1, bla, pBRori, (pGEX4T)</i>	Solsbacher <i>et al.</i> , 1998
BHUM 1241	<i>GST-XPO1, bla, pBRori, (pGEX4T)</i>	Fries <i>et al.</i> , 2007
BHUM 1309	<i>TEC1(P)::GFP::TEC1^{AS 125–150}::TEC1(t), 2μm, URA3, bla</i>	diese Arbeit
BHUM 1310	<i>TEC1(P)::GFP::TEC1^{AS 151–190}::TEC1(t), 2μm, URA3, bla</i>	diese Arbeit
BHUM 1312	<i>TEC1(P)::GFP::TEC1^{AS 301–379}::TEC1(t), 2μm, URA3, bla</i>	diese Arbeit
BHUM 1317	<i>TEC1(P)::GFP::TEC1^{AS 301–412, K343A, K344A}::TEC1(t), 2μm, URA3, bla</i>	diese Arbeit
BHUM 1318	<i>TEC1(P)::GFP::TEC1^{AS 301–412, I346N, K351A, K352A}::TEC1(t), 2μm, URA3, bla</i>	diese Arbeit
BHUM 1319	<i>TEC1(P)::GFP::TEC1^{AS 301–412, R358A, K359A}::TEC1(t), 2μm, URA3, bla</i>	diese Arbeit
BHUM 1320	<i>TEC1(P)::GFP::TEC1^{AS 301–412, K363A, R366A}::TEC1(t), 2μm, URA3, bla</i>	diese Arbeit
BHUM 1321	<i>TEC1(P)::GFP::TEC1^{AS 301–412, R369A}::TEC1(t), 2μm, URA3, bla</i>	diese Arbeit
BHUM 1322	<i>TEC1(P)::GFP::TEC1^{AS 333–412, H373R}::TEC1(t); 2μm, URA3, bla</i>	diese Arbeit
BHUM 1383	<i>TEC1(P)::GFP-Tec1^{K154A, K156A}::TEC1(t); 2μm, URA3, bla</i>	diese Arbeit
BHUM 1384	<i>MBP::TEC1^{R164A}::FLAG, bla, (pMALc2)</i>	Heise <i>et al.</i> , 2010
BHUM 1386	<i>TEC1(p)::GFP::TEC1^{AS 1–240, K156A}::TEC1(t), 2μm, URA3, bla</i>	diese Arbeit
BHUM 1387	<i>TEC1(p)::GFP::TEC1^{AS 1–240, R145A}::TEC1(t), 2μm, URA3, bla</i>	diese Arbeit
BHUM 1388	<i>MBP::TEC1^{L144A}::FLAG, bla, (pMALc2)</i>	Heise <i>et al.</i> , 2010
BHUM 1389	<i>MBP::TEC1^{L146A}::FLAG, bla, (pMALc2)</i>	Heise <i>et al.</i> , 2010
BHUM 1390	<i>MBP::TEC1^{K154A, I155A}::FLAG, bla, (pMALc2)</i>	Wunderlich, 2008
BHUM 1393	<i>MBP::TEC1^{N161A}::FLAG, bla, (pMALc2)</i>	Wunderlich, 2008
BHUM 1394	<i>MBP::TEC1^{G163A}::FLAG, bla, (pMALc2)</i>	Heise <i>et al.</i> , 2010
BHUM 1399	<i>TEC1(P)::GFP::TEC1^{R164A}::TEC1(t), 2μm, URA3, bla</i>	diese Arbeit
BHUM 1400	<i>TEC1(P)::GFP::TEC1^{K173A, K175A}::TEC1(t), 2μm, URA3, bla</i>	diese Arbeit
BHUM 1401	<i>MBP::TEC1^{S187A}::FLAG, bla, (pMALc2)</i>	Heise <i>et al.</i> , 2010
BHUM 1402	<i>TEC1(P)::GFP::TEC1^{S187A}::TEC1(t), 2μm, URA3, bla</i>	diese Arbeit
BHUM 1403	<i>TEC1(P)::GFP::TEC1^{K149A}::TEC1(t), 2μm, URA3, bla</i>	diese Arbeit

Fortsetzung Tabelle 11:

Plasmid	Genotyp	Referenz
BHUM 1405	<i>TEC1(P)::GFP::TEC1^{R145A}::TEC1(t)</i> , 2 μ m, URA3, <i>bla</i>	diese Arbeit
BHUM 1415	<i>TEC1(P)::GFP::TEC1^{AS 125–240}::TEC1(t)</i> , 2 μ m, URA3, <i>bla</i>	diese Arbeit
BHUM 1417	<i>TEC1(P)::GFP::TEC1^{AS 110–240}::TEC1(t)</i> , 2 μ m, URA3, <i>bla</i>	diese Arbeit
BHUM 1418	<i>TEC1(P)::GFP::TEC1^{AS 301–400}::TEC1(t)</i> , 2 μ m, URA3, <i>bla</i>	diese Arbeit
BHUM 1422	<i>TEC1(P)::GFP::TEC1^{AS 1–240, K154A}::TEC1(t)</i> , 2 μ m, URA3, <i>bla</i>	diese Arbeit
BHUM 1462	<i>MBP-TEC1-FLAG</i> , Kan ^R (pETM40)	van der Felden, 2008
BHUM 1474	<i>TEC1(P)::GFP::TEC1^{AS 1–240, K149A}::TEC1(t)</i> , 2 μ m, URA3, <i>bla</i>	diese Arbeit
BHUM 1475	<i>TEC1(P)::GFP::TEC1^{AS 1–240, K154A, K156A}::TEC1(t)</i> , 2 μ m, URA3, <i>bla</i>	diese Arbeit
BHUM 1476	<i>TEC1(P)::GFP::TEC1^{AS 1–240, K173A, K175A}::TEC1(t)</i> , 2 μ m, URA3, <i>bla</i>	diese Arbeit
BHUM 1477	<i>TEC1(P)::GFP::TEC1^{AS 1–240, L146A}::TEC1(t)</i> , 2 μ m, URA3, <i>bla</i>	diese Arbeit
BHUM 1478	<i>TEC1(P)::GFP::TEC1^{AS 1–240, K154A, I155A}::TEC1(t)</i> , 2 μ m, URA3, <i>bla</i>	diese Arbeit
BHUM 1480	<i>TEC1(P)::TEC1^{L146A}</i> , CEN, LEU2, <i>bla</i>	Heise <i>et al.</i> , 2010
BHUM 1482	<i>TEC1(P)::TEC1^{G163A}</i> , CEN, LEU2, <i>bla</i>	Heise <i>et al.</i> , 2010
BHUM 1483	<i>TEC1(P)::TEC1^{S187A}</i> , CEN, LEU2, <i>bla</i>	Heise <i>et al.</i> , 2010
BHUM 1484	<i>TEC1(P)::TEC1^{R164A}</i> , CEN, LEU2, <i>bla</i>	Heise <i>et al.</i> , 2010
BHUM 1488	<i>TEC1(P)::mCherry::TEC1^{AS 125–199}::TEC1(t)</i> , 2 μ m, TRP1, <i>bla</i>	diese Arbeit
BHUM 1497	<i>NOPI-GFP</i> , CEN, URA3, <i>bla</i>	Lange <i>et al.</i> , 2008
BHUM 1595	<i>TEC1(P)::GFP::TEC1^{AS 256–400}::TEC1(t)</i> , 2 μ m, URA3, <i>bla</i>	Wittkowski, 2009
BHUM 1598	<i>TEC1(P)::GFP::TEC1^{AS 256–400; K318A, R319A}::TEC1(t)</i> , 2 μ m, URA3, <i>bla</i>	Wittkowski, 2009
BHUM 1645	<i>TEC1(P)::GFP::TEC1^{AS 256–400; K318A}::TEC1(t)</i> , 2 μ m, URA3, <i>bla</i>	Wittkowski, 2009
BHUM 1646	<i>TEC1(P)::GFP::TEC1^{AS 256–400; R319A}::TEC1(t)</i> , 2 μ m, URA3, <i>bla</i>	Wittkowski, 2009
BHUM 1651	<i>TEC1(P)::GFP::TEC1^{K318A}::TEC1(t)</i> , 2 μ m, URA3, <i>bla</i>	Wittkowski, 2009
BHUM 1652	<i>TEC1(P)::GFP::TEC1^{R319A}::TEC1(t)</i> , 2 μ m, URA3, <i>bla</i>	Wittkowski, 2009

Fortsetzung Tabelle 11:

Plasmid	Genotyp	Referenz
BHUM 1653	<i>TEC1(P)::GFP::TEC1^{K149A, R319A}::TEC1(t)</i> , 2 μ m, URA3, <i>bla</i>	Wittkowski, 2009
BHUM 1665	<i>TEC1(P)::GFP::TEC1^{AS 1-240, R164A}::TEC1(t)</i> , 2 μ m, URA3, <i>bla</i>	diese Arbeit
BHUM 1666	<i>TEC1(P)::GFP::TEC1^{AS 1-240, S187A}::TEC1(t)</i> , 2 μ m, URA3, <i>bla</i>	diese Arbeit
BHUM 1669	<i>MBP-TEC1^{R319A}</i> , <i>Kan^R</i> (pETM40)	Wittkowski, 2009
BHUM 1670	<i>MBP::TEC1^{R145A}::FLAG</i> , <i>bla</i> , (pMALc2)	diese Arbeit
BHUM 1671	<i>MBP::TEC1^{K149A}::FLAG</i> , <i>bla</i> , (pMALc2)	diese Arbeit
BHUM 1672	<i>TEC1(P)::TEC1^{R145A}</i> , <i>CEN</i> , <i>LEU2</i> , <i>bla</i>	diese Arbeit
BHUM 1674	<i>TEC1(P)::TEC1^{K149A}</i> , <i>CEN</i> , <i>LEU2</i> , <i>bla</i>	diese Arbeit
BHUM 1676	<i>TEC1(P)::TEC1^{K318A}</i> , <i>CEN</i> , <i>LEU2</i> , <i>bla</i>	diese Arbeit
BHUM 1678	<i>TEC1(P)::TEC1^{R319A}</i> , <i>CEN</i> , <i>LEU2</i> , <i>bla</i>	diese Arbeit
BHUM 1680	<i>TEC1(p)::GFP::TEC1^{R164A, R319A}::TEC1(t)</i> , 2 μ m, URA3, <i>bla</i>	diese Arbeit
BHUM 1682	<i>TEC1(p)::GFP::TEC1^{K149A, K318A}::TEC1(t)</i> , 2 μ m, URA3, <i>bla</i>	diese Arbeit
BHUM 1688	<i>TEC1(P)::TEC1^{K173A, K175A}</i> , <i>CEN</i> , <i>LEU2</i> , <i>bla</i>	diese Arbeit
BHUM 1689	<i>TEC1(P)::TEC1^{K154A}</i> , <i>CEN</i> , <i>LEU2</i> , <i>bla</i>	diese Arbeit
BHUM 1690	<i>TEC1(p)::GFP::TEC1^{AS 1-240, L144A}::TEC1(t)</i> , 2 μ m, URA3, <i>bla</i>	diese Arbeit
BHUM 1692	<i>TEC1(p)::GFPuv::TEC1^{AS 301-340}::TEC1(t)</i> , 2 μ m, URA3, <i>bla</i>	diese Arbeit
BHUM 1730	<i>MBP::TEC1^{AS 301-400}::His₆</i> , <i>Kan^R</i> (pETM40)	diese Arbeit
BHUM 1735	<i>TEC1(P)::mCherry::TEC1^{AS 301-400}::TEC1(t)</i> , 2 μ m, URA3, <i>bla</i>	diese Arbeit
BHUM 1761	<i>TEC1(P)::TEC1^{L144A}</i> , <i>CEN</i> , <i>LEU2</i> , <i>bla</i>	diese Arbeit
BHUM 1763	<i>TEC1(P)::TEC1^{N161A}</i> , <i>CEN</i> , <i>LEU2</i> , <i>bla</i>	diese Arbeit
BHUM 1765	<i>TEC1(P)::TEC1^{K182A}</i> , <i>CEN</i> , <i>LEU2</i> , <i>bla</i>	diese Arbeit
BHUM 1767	<i>TEC1(P)::TEC1^{Q184A}</i> , <i>CEN</i> , <i>LEU2</i> , <i>bla</i>	diese Arbeit
BHUM 1769	<i>TEC1(P)::TEC1^{S186A}</i> , <i>CEN</i> , <i>LEU2</i> , <i>bla</i>	diese Arbeit
BHUM 1771	<i>TEC1(P)::TEC1^{Q190A}</i> , <i>CEN</i> , <i>LEU2</i> , <i>bla</i>	diese Arbeit
BHUM 1775	<i>TEC1(P)::TEC1^{K194A}</i> , <i>CEN</i> , <i>LEU2</i> , <i>bla</i>	diese Arbeit
BHUM 1777	<i>TEC1(P)::TEC1^{K156A}</i> , <i>CEN</i> , <i>LEU2</i> , <i>bla</i>	diese Arbeit
BHUM 1779	<i>TEC1(P)::GFP::TEC1^{AS 1-240, K182A}::TEC1(t)</i> , 2 μ m, URA3, <i>bla</i>	diese Arbeit
BHUM 1780	<i>TEC1(P)::GFP::TEC1^{AS 1-240, Q184A}::TEC1(t)</i> , 2 μ m, URA3, <i>bla</i>	diese Arbeit
BHUM 1781	<i>TEC1(P)::GFP::TEC1^{AS 1-240, S186A}::TEC1(t)</i> , 2 μ m, URA3, <i>bla</i>	diese Arbeit

Fortsetzung Tabelle 11:

Plasmid	Genotyp	Referenz
BHUM 1782	<i>TEC1(P)::GFP::TEC1^{AS 1-240, Q190A}::TEC1(t)</i> , <i>2μm, URA3, bla</i>	diese Arbeit
BHUM 1783	<i>TEC1(P)::GFP::TEC1^{AS 1-240, N161A}::TEC1(t)</i> , <i>2μm, URA3, bla</i>	diese Arbeit
BHUM 1812	<i>TEC1(P)::GFP::TEC1^{AS 1-240, G163A}::TEC1(t)</i> , <i>2μm, URA3, bla</i>	diese Arbeit
BHUM 1813	<i>TEC1(P)::GFP::TEC1^{AS 1-240, K194A}::TEC1(t)</i> , <i>2μm, URA3, bla</i>	diese Arbeit
BHUM 1841	<i>TEC1(P)::TEC1^{R164A, R319A}, CEN, LEU2, bla</i>	diese Arbeit
BHUM 1842	<i>TEC1(P)::TEC1^{K149A, K318A}, CEN, LEU2, bla</i>	diese Arbeit
BHUM 1843	<i>TEC1(P)::TEC1^{K149A, R319A}, CEN, LEU2, bla</i>	diese Arbeit
BHUM 1845	<i>MBP::TEC1^{K156A}::FLAG, bla, (pMALc2)</i>	diese Arbeit
BHUM 1847	<i>MBP::TEC1^{K182A}::FLAG, bla, (pMALc2)</i>	diese Arbeit
BHUM 1849	<i>MBP::TEC1^{S186A}::FLAG, bla, (pMALc2)</i>	diese Arbeit
BHUM 1851	<i>MBP::TEC1^{Q190A}::FLAG, bla, (pMALc2)</i>	diese Arbeit
BHUM 1925	<i>MBP::TEC1^{AS 125-240}::His₆, Kan^R (pETM40)</i>	diese Arbeit
pCR21	<i>tTA, tetO₇(P)::yeGFP-TDegF-2HA, NatNT2, bla</i>	Renicke, 2010

4.7 Verwendete Oligonukleotide

Synthetische Oligonukleotide werden in PCR- oder Sequenzierreaktionen als Initiatoren (Primer) benutzt bzw. in Mobilitätsshift-Assays (EMSA) als markierte DNA. Die in dieser Arbeit verwendeten Oligonukleotide sind nachfolgend aufgelistet (Tabelle 12).

Tabelle 12: Oligonukleotide

Bezeichnung	Sequenz	Verwendung
SK-BHUM570-1	ACA CCG CGG ACT GTC GAC AGA TCT TTT GTA G	Einfügen der Schnittstellen SacII und AvrII in BHUM 570 ⇒ BHUM 1156
SK-BHUM570-2	ACA CCG CGG GAA CCT AGG TAA ATG TCT ACA TAC ATA CAT AC	
SK-TEC1-6b	ACA CCG CGG CTT AAA GAA GAC GAC TTT GGC	Klonierung von GFP-TEC1-Fragmenten
SK-TEC1-7b	ACA CCT AGG ATA AAA GTT CCC ATG CGA TTG G	Klonierung von GFP-TEC1-Fragmenten
SK-TEC1-8b	AGA CCT AGG GTC GAT AAT TTC TTC AAA TAT G	Klonierung von GFP-TEC1-Fragmenten
SK-TEC1-9b	AGA CCG CGG TCT CTA CCT TCA GTC AGT GAT	Klonierung von GFP-TEC1-Fragmenten
SK-TEC1-10b	AGA CCT AGG CGT TGT TGA CGA CGT TTC GC	Klonierung von GFP-TEC1-Fragmenten
SK-TEC1-11b	AGA CCG CGG TAC TTT CCC GGA CAA AGT AGC	Klonierung von GFP-TEC1-Fragmenten

Fortsetzung Tabelle 12:

Bezeichnung	Sequenz	Verwendung
SK-TEC1-12b	AGA CCT AGG TTT TGA ATG TAC TGA CAA TCC AC	Klonierung von GFP-TEC1-Fragmenten
SK-TEC1-13b	AGA CCG CGG CCT AAA AAC CTC TAT GTA AGT AA	Klonierung von GFP-TEC1-Fragmenten
SK-TEC1-14b	AGA CCT AGG GTA GTA TGG CAC TGG TCT GC	Klonierung von GFP-TEC1-Fragmenten
SK-TEC1-15b	AGA CCG CGG GTA GTC CCA AGA TCA GCC AC	Klonierung von GFP-TEC1-Fragmenten
SK-TEC1-16b	ACA CCT AGG TTT GTT TTG TAT GGT CTT CTT	Klonierung von GFP-TEC1-Fragmenten
SK-TEC1-17b	ACA CCG CGG TGG ACT ATC GGT TGT GAT AAG	Klonierung von GFP-TEC1-Fragmenten
SK-TEC1-18b	ACA CCT AGG TTG AAT ATG GGA AGA AAT TTG	Klonierung von GFP-TEC1-Fragmenten
SK-TEC1-19b	ACA CCG CGG GTC TGG AAG AAG ACC ATA C	Klonierung von GFP-TEC1-Fragmenten
SK-TEC1-20b	ACA CCT AGG GGC TGA TCT TGG GAC TAC TTC	Klonierung von GFP-TEC1-Fragmenten
SK-TEC1-21b	ACA CCG CGG TAC GCT AAG CAC ATT TAT G	Klonierung von GFP-TEC1-Fragmenten
SK-TEC1-22b	ACA CCT AGG TCC CTG GTG GAG TTC CGT G	Klonierung von GFP-TEC1-Fragmenten
SK-TEC1-23b	ACA CCG CGG GAT CGC CCC AAT AAG GCT AG	Klonierung von GFP-TEC1-Fragmenten
SK-TEC1-24b	ACA CCG CGG AAG GCA ATC CTG GAG AGT GC	Klonierung von GFP-TEC1-Fragmenten
SK-TEC1-25b	ACA CCT AGG ATG TTC TTG TAT GCG GGA AAT TC	Klonierung von GFP-TEC1-Fragmenten
SK-TEC1-24b	ACA CCG CGG AAG GCA ATC CTG GAG AGT GC	Klonierung von GFP-TEC1-Fragmenten
SK-TEC1-25b	ACA CCT AGG ATG TTC TTG TAT GCG GGA AAT TC	Klonierung von GFP-TEC1-Fragmenten
SK-TEC1-26b	GAC ACC TAG GAT TTT TCA TTA TCA GTC TAA GTG	Klonierung von GFP-TEC1-Fragmenten
SK-TEC1-27b	GAC ACC GCG GGG GAC CAC AAA AAT AAA AAT AA	Klonierung von GFP-TEC1-Fragmenten
SK-TEC1-28b	GAA CAC CTA GGC AGG TTT GAG TTT TCA GTA GT	Klonierung von GFP-TEC1-Fragmenten
SK-TEC1-29b	GAA CAC CTA GGG AAC TCA GGA TTA CTT TCA	Klonierung von GFP-TEC1-Fragmenten
SK-F12-1 D&D (f)	GAA TTC GAT ATC AAG CTT ATC GAT ACC GTC GAC A GTC TGG AAG AAG ACC ATA CAA	Klonierung von GFP-TEC1-Fragmenten
SK-F12-2 D&D (r)	GCG TGA CAT AAC TAA TTA CAT GAC TCG AGG TCG AC TTT TGA ATG TAC TGA CAA TCC AC	Klonierung von GFP-TEC1-Fragmenten
SK-GFP-1 (f)	TGT AAC TGC TGC TGG GAT TAC	Sequenzierung
SK-TEC1(t)-1 (r)	CTG TGA CGG TTC TTA CTA CG	Sequenzierung
SK-TEC1(t)-3 rev	CCG ACT TGA ATG ATT TTC AAG G	Sequenzierung
SK-TEC1-M1 (f)	ATG GGA CCA CAG CAA TAG CAA TAA GAA ATG	Mutagenese K154A, K156A
SK-TEC1-M1 (r)	CAT TTC TTA TTG CTA TTG CTG TGG TCC CAT	

Fortsetzung Tabelle 12:

Bezeichnung	Sequenz	Verwendung
SK-TEC1-M2 (f)	ATT TTG GAG CAA ACG AGC TGA TTT C	Mutagenese R164A
SK-TEC1-M2 (r)	GAA ATC AGC TCG TTT GCT CCA AAA T	
SK-TEC1-M3 (f)	TAT ATC GCG CAC GCA ACC AAC GAG TTC	Mutagenese K173A, K175A
SK-TEC1-M3 (r)	GAA CTC GTT GGT TGC GTG CGC GAT ATA	
SK-TEC1-M5 (f)	TTT TCC AAC GCG GCG GCA ATC CTG	Mutagenese K343A, K344A
SK-TEC1-M5 (r)	CAG GAT TGC CGC CGC GTT GGA AAA	
SK-TEC1-M6 (f)	CTG GAG AGT GCA GCA GCA ATC GAA ATA GAG	Mutagenese K351A, K352A
SK-TEC1-M6 (r)	CTC TAT TTC GAT TGC TGC TGC ACT CTC CAG	
SK-TEC1-M7 (f)	GAA ATA GAG CAG GCA GCG ATA ATC AAC	Mutagenese R358A, K359A
SK-TEC1-M7 (r)	GTT GAT TAT CGC TGC CTG CTC TAT TTC	
SK-TEC1-M8 (f)	ATA ATC AAC GCA TAC CAA GCA ATT TCC CGC	Mutagenese K363A, R366A
SK-TEC1-M8 (r)	GCG GGA AAT TGC TTG GTA TGC GTT GAT TAT	
SK-TEC1-M9 (f)	TAC CAA AGA ATT TCC GCC ATA CAA GAA C	Mutagenese R369A
SK-TEC1-M9 (r)	GTT CTT GTA TGG CGG AAA TTC TTT GGT A	
SK-TEC1-M10 (f)	TCC CGC ATA CAA GAA CGT GAA AGT AAT C	Mutagenese H373R
SK-TEC1-M10 (r)	GAT TAC TTT CAC GTT CTT GTA TGC GGG A	
SK-TEC1-M12 (f)	CCT TGA GGC AGC TAG ACT GAT AAT G	Mutagenese L144A
SK-TEC1-M12 (r)	CAT TAT CAG TCT AGC TGC CTC AAG G	
SK-TEC1-M13 (f)	GAG GCA CTT AGA GCG ATA ATG AAA AAT GGG	Mutagenese L146A
SK-TEC1-M13 (r)	CCC ATT TTT CAT TAT CGC TCT AAG TGC CTC	
SK-TEC1-M14 (f)	GGG ACC ACA GCA GCA AAA ATA AGA AAT GCC	Mutagenese K154A, I155A
SK-TEC1-M14 (r)	GGC ATT TCT TAT TTT TGC TGC TGT GGT CCC	
SK-TEC1-M17 (f)	ATA AGA AAT GCC GCT TTT GGA AGA AAC GAG	Mutagenese N161A
SK-TEC1-M17 (r)	CTC GTT TCT TCC AAA AGC GGC ATT TCT TAT	
SK-TEC1-M18 (f)	GAA ATG CCA ATT TTG GCA GAA ACG AGC TG	Mutagenese G163A
SK-TEC1-M18 (r)	CAG CTC GTT TCT GCC AAA ATT GGC ATT TC	
SK-TEC1-M25 (f)	AAG CAA ATT TCT GCC CAT ATT CAA GTC	Mutagenese S187A
SK-TEC1-M25 (r)	GAC TTG AAT ATG GGC AGA AAT TTG CTT	
SK-M27 (f)	GGG ACC ACA GCA ATA AAA ATA AG	Mutagenese K154A
SK-M27 (r)	CTT ATT TTT ATT GCT GTG GTC CC	
SK-M28 (f)	GGG ACC ACA AAA ATA GCA ATA AG	Mutagenese K156A
SK-M28 (r)	CTT ATT GCT ATT TTT GTG GTC CC	
SK-M30 (f)	CTT GAG GCA CTT GCA CTG ATA ATG AAA AAT G	Mutagenese R145A
SK-M30 (r)	CAT TTT TCA TTA TCA GTG CAA GTG CCT CAA G	
SK-M31 (f)	GAC TGA TAA TGG CAA ATG GGA CCA C	Mutagenese K149A
SK-M31 (r)	GTG GTC CCA TTT GCC ATT ATC AGT C	
SK-TEC1 M33(f)	GTT CAG AAC CGC AAA GCA AAT TT	Mutagenese K182A
SK-TEC1 M33(r)	AAA TTT GCT TTG CGG TTC TGA AC	
SK-TEC1 M34(f)	AAC CAA AAA GGC AAT TTC TTC C	Mutagenese Q184A
SK-TEC1 M34(r)	GGA AGA AAT TGC CTT TTT GGT T	
SK-TEC1 M35(f)	AAG CAA ATT GCT TCC CAT ATT CAA	Mutagenese S186A
SK-TEC1 M35(r)	TTG AAT ATG GGA AGC AAT TTG CTT	
SK-TEC1 M36(f)	CCC ATA TTG CAG TCT GGA AGA A	Mutagenese Q190A
SK-TEC1 M36(r)	TTC TTC CAG ACT GCA ATA TGG G	
SK-TEC1 M37(f)	GTC TGG AAG GCG ACC ATA CAA A	Mutagenese K194A

Fortsetzung Tabelle 12:

Bezeichnung	Sequenz	Verwendung
SK-TEC1 M37(r)	TTT GTA TGG TCG CCT TCC AGA C	
Tec1 K318A FP	GCG TTC CGT CAG CGA GGC CTC TTG	Mutagenese K318A
Tec1 K318A RP	CAA GAG GCC TCG CTG ACG GAA CGC	
Tec1 R319A FP	GTT CCG TCA AAG GCG CCT CTT GAA C	Mutagenese R319A
Tec1 R319A RP	GTT CAA GAG GCG CCT TTG ACG GAA C	
SK-mCherry1	TAG AGA TCT GAT GGT GAG CAA GGG CGA G	Klonierung von mCherry
SK-mCherry2	ATA AGA TCT CTT GTA CAG CTC GTC CAT GC	
SK-Nup49 tagging forw.	TGA GAG AAT CGC CGT GTT ACA TCA AAA AAC GAA AAC ACT GGC ATC ATT GAG CAT ACG TAC GCT GCA GGT CGA C	Genomische Markierung von <i>NUP49</i>
SK-Nup49 tagging rev	GTA CAA GAC ATT TGT ACT TGT TAT ACG CAC TAT ATA AAC TTT CAG GGC GAT TTA CAT CGA TGA ATT CGA GCT CG	
SK-Nup49 NT 1053-1072 forw	GGT GCT CTT ACA GCA ACT AT	Test-PCR für <i>NUP49</i> -Markierung
SK-Nup49 term 271bp rev	GGT GGC TTG CCT GTT CGA T	
SK-PSE1-S1	CTT TAT CCT AAC GAC ACG TGA TTT CAA CCG TAA CTA GAG CCA TCG CTA TGC GTA CGC TGC AGG TCG AC	Genomische Markierung von <i>PSE1</i> für Tipi-System
SK-PSE1-S4	GCC TGG ACA ATC TGA AGT AAT GTT CTA TTA ACT TCT TCC GGT AAA GCA GAC ATC GAT GAA TTC TCT GTC G	
SK-PSE1(Prom) forw	GTT GAT AAA TAA TCC AAT AGC C	Test-PCR für <i>PSE1</i> -Markierung
SK-TEC1 125-240 Nco (f)	AGA CCA TGG ACT GGA CTA TCG GTT GTG ATA AG	Klonierung von BHUM 1925
SK-TEC1-125-240 XhoI (r)	AGA CTC GAG GTC GAT AAT TTC TTC AAA TAT GTC	
SK-TEC1 301-401 Nco (f)	CCA TGG AC TAC GCT AAG CAC ATT TAT GAA AAC	Klonierung von BHUM 1730
KW-TEC1-301-400 RP+ XhoI	AGA CTC GAG GGC TGA TCT TGG GAC TAC TTC	
BHTCS1_1	GGC GGA TCT GCT CGA GTC ACA TTC TTC TGC TCG AGC CTA AAA ATT C – Cy5	EMSA
BHTCS1_2	GAA TTT TTA GGC TCG AGC AGA AGA ATG TGA CTC GAG CAG ATC CGC C	

5. Methoden

5.1 Kultivierung von Mikroorganismen

5.1.1 Kultivierung von *Escherichia coli*

E. coli-Zellen wurden in Luria-Bertani-Vollmedium (LB) (1 % (w/v) Trypton, 0,5 % (w/v) Hefeextrakt, 1 % (w/v) NaCl) kultiviert. Festmedium enthielt 2 % Agar. Enthielten die Zellen Plasmide mit einer Resistenzkassette, wurde dem Medium das entsprechende Antibiotikum zugegeben, um den Selektionsdruck auf das Plasmid aufrecht zu erhalten. Dabei betrug die Endkonzentration von Ampicillin 100 µg/ml, von Kanamycin 75 µg/ml und von Chloramphenicol 25 µg/ml. Die Inkubation der Zellen erfolgte bei 37 °C. Das Wachstum wurde durch Messung der OD_{600nm} verfolgt. Dabei entspricht eine OD_{600nm} = 1 einer Zelldichte von ca. $2 \cdot 10^8$ Zellen/ml (Sherman *et al.*, 1986).

5.1.2 Kultivierung von *Saccharomyces cerevisiae*

Die *S. cerevisiae*-Stämme wurden in Yeast Extract/Peptone/Dextrose (YEPD)-Medium kultiviert (2 % (w/v) Peptone, 1 % (w/v) Hefeextrakt, 2 % (w/v) Glukose). Für feste Medien wurde 2 % (w/v) Agar zugefügt. Mit Plasmiden transformierte Stämme wurden in Minimalmedium „Yeast nitrogen base“ (YNB) (0,15 % (w/v) Yeast Nitrogen Base ohne Aminosäuren und ohne (NH₄)₂SO₄, 0,5 % (w/v) (NH₄)₂SO₄, 0,2 mM myo-Inositol, 2 % (w/v) Glukose) oder im Selektionsmedium „Synthetic-Complete“ ohne Uracil, Leucin, Tryptophan und Histidin (SC-4)-Medium herangezogen. Für dieses Medium wird das Minimalmedium mit 0,2 % (w/v) Aminosäure-Mix (0,2 g p-Aminobenzoat + 2 g jeder Standard-Aminosäure außer Tryptophan, Histidin, Uracil und Leucin) supplementiert.

Die Kultivierung der Zellen erfolgte bei 30 °C. Das Wachstum der Hefezellen wurde durch Messung der OD_{600nm} verfolgt. Eine OD_{600nm} von 1 entspricht einer Zelldichte von ca. $1,5 \cdot 10^7$ Zellen/ml (Sherman *et al.*, 1986).

5.2 Isolierung von Nukleinsäuren

5.2.1 Isolierung von genomischer DNA aus *S. cerevisiae* (Hoffman & Winston, 1987)

10 ml Hefekultur wurde 1–2 Tage lang bei 30 °C inkubiert. Die Zellen wurden dann durch Zentrifugation (2 Minuten, 3000 x g) geerntet, in 500 µl dH₂O resuspendiert und in ein 1,5 ml Reaktionsgefäß mit Schraubdeckel überführt. Durch kurzes Zentrifugieren wurden die Zellen erneut pelletiert. Der Überstand wurde abgegossen und die Zellen in der Restflüssigkeit resuspendiert. Es wurden 200 µl Lysepuffer (2 % Triton X-100, 1 % SDS, 100 mM NaCl,

10 mM Tris pH 8,0, 1 mM EDTA), 200 µl Phenol/TE und 0,3 g Glaskügelchen (Ø 0,45–0,5 mm, CARL ROTH GMBH) zugegeben. Zum Aufbrechen der Zellen wurde dieses Gemisch 5 Minuten lang auf einem Vibrax-Gerät geschüttelt. Anschließend wurde 5 Minuten bei 13000 rpm zentrifugiert und die wässrige Phase in ein neues Reaktionsgefäß überführt. 1 ml Ethanol wurde zum Fällern der DNA zugegeben. Nach erneuter Zentrifugation (5 Minuten, 13000 rpm) wurde der Überstand abgenommen und das Pellet in 400 µl TE (10 mM Tris-HCl, 1 mM EDTA pH 8,0) aufgenommen. Zum Abbau der RNA wurde 3 µl RNaseA-Lösung (10 mg/ml) zugegeben und 5 Minuten bei 37 °C inkubiert. Dann wurden 10 µl 4 M Ammonium-acetat und 1 ml Ethanol zugegeben und gemischt. Es folgte eine Zentrifugation (2 Minuten, 13000 rpm). Der Überstand wurde abgenommen und das getrocknete Pellet schließlich in 50 µl TE (100mM Tris-HCl pH 8,0, 10 mM EDTA) resuspendiert.

5.2.2 Isolierung von Plasmid-DNA aus *E. coli* (Birnboim & Doly, 1979)

E. coli-Stämme mit den gewünschten Plasmiden wurden in Selektivmedium (LB + Antibiotikum) über Nacht bei 37 °C herangezogen. Von 1,5 ml der Kultur wurden die Zellen durch Zentrifugation pelletiert und der Überstand verworfen. Die Zellen wurden in 100 µl Puffer 1 (50 mM Glukose, 25 mM Tris/HCl pH 8,0, 10 mM EDTA pH 8,0) resuspendiert. Durch Zugabe von 200 µl Puffer 2 (0,2 M NaOH, 1 % SDS) erfolgte die alkalische Lyse der Zellen. Schließlich wurden 150 µl Puffer 3 (3 M KAc, 5 M Eis-essig) zugegeben. Nach fünf-minütiger Inkubation auf Eis wurde die in Lösung befindliche Plasmid-DNA von den ausgefallenen Zellbestandteilen durch Zentrifugation (10 Minuten bei 13000 rpm) getrennt. Der Überstand wurde in ein neues Reaktionsgefäß überführt und 700 µl 100 %-iges Ethanol zugegeben, um die DNA zu fällen. Dazu wurde der Ansatz zusätzlich für 10 Minuten bei –20 °C inkubiert. Anschließend konnte die DNA durch Zentrifugation (10 Minuten bei 13000 rpm) pelletiert werden und anschließend das getrocknete Pellet in 25 µl resuspendiert werden. Zugabe von 2 µl RNaseA (10mg/ml) degradierte die noch im Ansatz enthaltenen RNA-Moleküle.

Alternativ wurde Plasmid-DNA mit Hilfe des „mi-Plasmid Mini prep“-Kits (METABION, Martinsried, D) isoliert, wobei nach Herstellerangaben vorgegangen wurde. Die Konzentration der DNA-Lösung wurde photometrisch bei 260 nm mit dem NanoDrop® ND-1000 Spektrophotometer (PEQLAB BIOTECHNOLOGIE GMBH (Erlangen, D) bestimmt.

5.2.3 Isolierung von Plasmiden aus *S. cerevisiae* (Robzyk & Kassir, 1992)

Die Zellen von 1,5 ml Übernachtskultur wurden in 100 µl STE-Puffer (8 % (w/v) Saccharose, 50 mM EDTA, 5 % (w/v) Triton X-100, 50 mM Tris-HCl pH 8,0) resuspendiert und nach Zugabe von 200 µl Glasperlen (Ø 0,25–0,50 mm) durch fünf-minütiges Schütteln auf einem

Vibrax aufgebrochen. Nach Zugabe von weiteren 100 µl STE-Puffer wurde der Extrakt 3 Minuten lang bei 100 °C erhitzt und anschließend bei 4 °C 10 Minuten bei 13000 × g abzentrifugiert. 100 µl des Überstands wurden mit 50 µl 7,5 M Ammoniumacetat gemischt, eine Stunde bei –20 °C gekühlt und erneut zentrifugiert. Danach wurden 100 µl des Überstands mit 200 µl eiskaltem Ethanol gemischt, die DNA durch Zentrifugation (10 Minuten bei 4 °C und 13000 × g) pelletiert und in 20 µl H₂O resuspendiert. 10 µl dieser Lösung wurden für *E. coli*-Transformationen eingesetzt.

5.3 Klonierungstechniken und Mutagenese von DNA

5.3.1 Polymerase-Kettenreaktion (Saiki et al., 1985; Mullis et al., 1986)

In der Polymerase-Kettenreaktion (Polymerase Chain Reaction, PCR) findet eine Amplifizierung eines bestimmten DNA-Fragmentes statt. Es wurden die thermostabilen Enzyme Taq-Polymerase (FERMENTAS), Pfu-Polymerase (FERMENTAS), PhusionTM-Polymerase (NEW ENGLAND BIOLABS) und KOD-HiFi-Polymerase (NOVAGEN) verwendet. Die Oligonukleotide (Primer) wurden in einer Konzentration von 5-50 pmol verwendet und zusammen mit 10–100 ng Matrizen-DNA in 20–50 µl Reaktionsvolumen entsprechend den Angaben des Herstellers eingesetzt. Die Art und Dauer des Temperaturprofils richtete sich nach den Angaben der Hersteller, den verwendeten Oligonukleotiden und der Matrize.

5.3.2 Enzymatische Spaltung von DNA mit Hilfe von Restriktionsendonukleasen

Für analytische Restriktionsreaktionen wurden ca. 0,5 µg DNA mit 1–2 Units Restriktionsenzym (FERMENTAS oder NEW ENGLAND BIOLABS) in einem Volumen von 20 µl für 2–3 Stunden bei 37 °C inkubiert. Für die Restriktion präparativer Mengen DNA wurden entsprechend größere Volumina und Enzymmengen eingesetzt. Reaktionspuffer wurden nach den Angaben des Herstellers verwendet.

5.3.3 Gelelektrophorese von DNA in Agarosegelen

Für analytische Gele, sowie für Gele aus denen anschließend DNA isoliert werden sollte, wurde TAE-Puffer (40 mM Tris-Base, 20 mM Essigsäure, 2 mM EDTA, pH 8,3) mit 1 % (w/v) Agarose aufgeköcht. Nach dem Abkühlen auf etwa 60 °C wurde die viskose Lösung in Gelkammern gegossen. Als Laufpuffer diente ebenfalls TAE-Puffer. Die aufzutrennenden DNA-Proben wurden vor dem Auftragen mit DNA-Auftragspuffer (40 % Saccharose, 0,25 % Orange G) versetzt. Nach der elektrophoretischen Auftrennung bei 90 V Gleichspannung wurde das Gel für ca. 10 Minuten in eine Ethidiumbromid-Färbelösung (70 µl Ethidiumbromidlösung pro 100 ml H₂O) gelegt. Dann konnte die DNA durch Bestrahlung mit UV-Licht bei $\lambda = 254$ nm

mittels eines UV-Transilluminators bzw. durch die Gel-Doc-XR (BIORAD INDUSTRIES GMBH, München, D) sichtbar gemacht werden. Um die Größe der DNA-Fragmente bestimmen zu können, wurde der „GeneRulerTMDNA-Ladder Mix“ (FERMENTAS) als Größenstandard verwendet.

5.3.4 Isolierung von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen

Die mit Ethidiumbromid gefärbte DNA wurde durch einen UV-Transilluminator bei $\lambda=254$ nm detektiert. Das Gelstück mit den gewünschten DNA-Fragmenten wurde mit einem Skalpell ausgeschnitten und in ein Reaktionsgefäß überführt. Die Reinigung der DNA-Fragmente aus dem Gel erfolgte mit dem „E.Z.N.A. Gel Extraktions Kit“ (VWR INTERNATIONAL GMBH) und wurde gemäß dem zugehörigen Protokoll durchgeführt.

5.3.5 Ligation von DNA-Fragmenten in Vektoren

Für die Ligationsreaktion linearer DNA-Fragmente wurden etwa 1–10 µg/ml DNA in einem Verhältnis von 1:5 (Vektor : Insert-DNA) verwendet. Die Reaktion wurde in Ligationspuffer und mit 1 Unit T4-DNA-Ligase in einem Gesamtvolumen von 20 µl angesetzt und mindestens eine Stunde bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend wurde die Ligase durch Hitze inaktiviert (10 Minuten bei 65 °C).

5.3.6 Sequenzspezifische Punktmutagenese (Weiner et al., 1994)

Für die Einführung von Punktmutationen in *TEC1* wurden Primer mit der gewünschten Mutation synthetisiert und auf einem Plasmid kodierte Wildtyp-*TEC1* als Matrize verwendet. Bei der folgenden PCR wurde jeweils das gesamte Plasmid amplifiziert. Um die etwaige Anhäufung zusätzlicher Mutationen zu vermeiden, wurden nur 15–20 Zyklen der PCR-Reaktion durchgeführt. Anschließend wurde die methylierte Template-DNA mit der Restriktionsendonuklease *DpnI* geschnitten. Das neu synthetisierte Plasmid mit der gewünschten Mutation wird dabei nicht geschnitten, da es unmethyliert ist. *E. coli*-Zellen wurden dann mit der DNA transformiert und aus den entstandenen Klonen die Plasmide isoliert. Durch Sequenzierung wurde überprüft, ob die gewünschte Mutation enthalten war.

5.3.7 Fällung von DNA mit Ethanol

Zum Fällen von in Lösung befindlicher DNA wurden 1/10 Volumen 3 M Natriumacetat (pH 4,8) und 2,5 Volumen 100 %-iges Ethanol hinzugegeben und durch Invertieren gemischt. Es folgte eine Inkubation bei –20 °C für eine Stunde. Anschließend wurde die gefällte DNA durch Zentrifugation (10 Minuten bei 13000 rpm) pelletiert. Mit 900 µl 70 %-igem Ethanol

wurde die DNA gewaschen und schließlich an der Luft getrocknet. Zuletzt wurde die DNA dann in 10 µl dH₂O wieder gelöst.

5.4 Transformationsmethoden

5.4.1 Transformation von *S. cerevisiae* (modifiziert nach Ito et al., 1983)

Die zu transformierenden *S. cerevisiae*-Stämme wurden über Nacht bei 30 °C in 5 ml YEPD-Medium angezogen. Damit wurde eine Hauptkultur (20 ml YEPD) im Verhältnis 1:50 angeimpft und 6 Stunden lang bei 30 °C schüttelnd inkubiert. Dann wurden die Zellen durch Zentrifugation (3 Minuten bei 2500 x g) pelletiert und mit 10 ml sterilem dH₂O gewaschen. Danach wurden die Zellen mit 2 ml sterilem SORB-Puffer (100 mM Lithiumacetat, 10 mM Tris, 1 mM EDTA, 1 M Sorbitol, pH 8,0) gewaschen und schließlich in 180 µl SORB-Puffer resuspendiert. 20 µl durch Hitze denaturierte Lachs-Spermien-DNA wurden hinzugegeben und die Zellen in Aliquots à 50 µl aufgeteilt. Die so vorbereiteten kompetenten Zellen können entweder direkt transformiert werden oder bis zur Verwendung bei –80 °C gelagert werden. Zur Transformation wurden 2–10 µl Plasmid-DNA und 300 µl PEG-Puffer zugegeben und für 30 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend erfolgte ein Hitzeschock bei 42 °C für 15 Minuten. Danach wurden die Zellen durch Zentrifugation (1 Minute bei 2000 rpm) pelletiert und der Überstand abgenommen. Die Zellen wurden nun mit 1 ml YEPD gewaschen, in 200 µl frischem YEPD aufgenommen und auf Selektivmedium ausplattiert. Nach 3–4 Tagen bei 30 °C waren aus den transformierten Zellen sichtbare Kolonien gewachsen.

5.4.2 Transformation von *E. coli*

5.4.2.1 Herstellung chemisch kompetenter *E. coli*-Zellen (Sambrook et al., 1989)

1000 ml LB-Medium wurden mit 20 ml einer Übernachtskultur des gewünschten *E. coli*-Stammes angeimpft und das Medium mit jeweils 10 mM MgCl₂ und MgSO₄ supplementiert. Die Kultur wurde bei 37 °C inkubiert, bis sie eine OD_{600nm} von 0,6 erreicht hatte. Die Kultur wurde dann auf Eis gekühlt und anschließend die Zellen geerntet (3000 rpm, 10 Minuten, 4 °C). Das Pellet wurde in 330 ml gekühlter RF1-Lösung (100 mM RbCl, 50 mM MnCl₂ x 4 H₂O, 30 mM Kaliumacetat, 10 mM CaCl₂ x 2 H₂O, 15 % Glycerin, pH 5,8 mit Essigsäure eingestellt) resuspendiert. Die Suspension wurde 15 Minuten lang bei 4 °C inkubiert. Danach wurden die Zellen durch Zentrifugation erneut pelletiert und in gekühltem RF2-Puffer (10 mM MOPS, 10 mM RbCl, 75 mM CaCl₂ x 2 H₂O, 15 % Glycerin, pH 5,8 mit Essigsäure eingestellt) resuspendiert. Es folgte eine Inkubation bei 4 °C für 30 Minuten, bevor die nun kompetenten Zellen in Aliquots à 100 µl in flüssigem Stickstoff eingefroren und bei –80 °C gelagert wurden.

5.4.2.2 Transformation von *E. coli* (modifiziert nach Mandel & Higa, 1970)

100 µl kompetente *E. coli*-Zellen wurden auf Eis aufgetaut und mit 1–5 µl DNA-Lösung gemischt. Nach einer 30-minütigen Inkubation auf Eis erfolgte ein Hitzeschock bei 42 °C für eine Minute. Danach wurde 800 µl LB-Medium hinzugegeben und bei 37 °C schüttelnd für ca. eine Stunde inkubiert, damit sich die Antibiotika-Resistenz ausbilden konnte. Anschließend wurde der Transformationsansatz auf LB-Festmedium, welches das erforderliche Antibiotikum zur Selektion auf den Vektor enthielt, ausplattiert. Die Inkubation erfolgte über Nacht bei 37 °C.

5.5 Analyse von Proteinen

5.5.1 Herstellung von Proteinextrakten aus *S. cerevisiae*

5.5.1.1 „Rapid protein extraction from yeast“ (nach Kushnirov, 2000)

Von Hefekulturen, die bis zur exponentiellen Phase gewachsen waren, wurden jeweils gleiche Zellmengen geerntet. Dazu wurde die OD_{600nm} der Kulturen mit dem Photometer gemessen und berechnet, in welchem Volumen eine Zellmenge enthalten ist, die einer OD_{600nm} von 3 entspricht. Die Zellen wurden durch Zentrifugation bei 5000 × g für 5 Minuten pelletiert, das Medium abgenommen und die Zellen in 100 µl Wasser resuspendiert. Nach Zugabe von 100 µl 0,2 M NaOH wurden die Zellen 5 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert und anschließend eine Minute bei 6000 rpm zentrifugiert. Der Überstand wurde abgenommen und die Zellen in 50 µl 1,5x SDS-Probenpuffer (60 mM Tris-HCl pH 6,8; 8,5 % Glycerin, 2 % SDS, 4 % β-Mercaptoethanol, 0,0025 % Bromphenolblau) resuspendiert. Anschließend folgte eine Inkubation bei 95 °C für 5 Minuten und Zentrifugation für 5 Minuten bei 13000 rpm.

5.5.1.2 „Alkalische Lyse“ (Yaffe & Schatz, 1984)

Zu 1 ml Hefekultur wurden 150 µl Lysepuffer (139 µl 2 M NaOH + 11 µl β-Mercaptoethanol) hinzugefügt und für 10 Minuten auf Eis inkubiert. Durch Zugabe von 150 µl 55 % (w/v) Trichloressigsäure und erneute Inkubation auf Eis für 10 Minuten wurden die Proteine gefällt. Das nach der Zentrifugation (10 Minuten bei 13000 rpm) entstandene Pellet wurde in 25 µl HU-Puffer (8 M Urea, 5 % (w/v) SDS, 200 mM NaHPO₄ (pH 6,8), 0,1 mM EDTA, 0,1 % (w/v) Bromphenolblau, 15 mg/ml DTT) resuspendiert und die Probe für 5 Minuten bei 95 °C aufgeköcht.

5.5.2 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (modifiziert nach Laemmli, 1970)

Von den Proteinextrakten wurden jeweils gleiche Volumina auf ein 6-, 8- oder 12 %-iges, diskontinuierliches Polyacrylamidgel aufgetragen und elektrophoretisch aufgetrennt. Die

Polyacrylamidgele bestanden aus einem Sammelgel (375 mM Tris pH 6,8, 3 % (v/v) Acrylamid) und einem Trenngel (375 mM Tris pH 8,8, 6–12 % v/v Acrylamid). Durch Zugabe von Ammoniumpersulfat und TEMED erfolgte die Polymerisation der Gele. Die Elektrophorese erfolgte in Elektrophoresepuffer (25 mM TrisBase, 192 mM Glycin, 1 % SDS) zunächst für 10 Minuten bei 60 V und anschließend für 35–45 Minuten bei 200 V. Als Größenstandard wurde der „Prestained Protein Molecular Weight Marker“ (FERMENTAS) verwendet.

5.5.3 Immunchemische Detektion von Proteinen auf Nitrocellulose-Membranen: „Western Blot“ (Towbin *et al.*, 1979)

Der Transfer der im SDS-Polyacrylamidgel aufgetrennten Proteinextrakte auf eine Protran Nitrocellulosemembran (SCHLEICHER & SCHUELL (Dassel, D)) erfolgte durch einen Elektroblot bei 35 V über Nacht oder bei 100 V für 60 Minuten in Transfer-Puffer (25 mM TrisBase, 192 mM Glycin, 0,2 % SDS, 20 % Methanol). Die unspezifischen Bindungsstellen der Membran wurden durch Waschen mit TBS (140 mM Tris Base, 1 M NaCl) + 3 % Milchpulver für 30 Minuten abgedeckt. Danach wurde die Membran für 1–2 Stunden mit dem in TBS + 3 % Milchpulver verdünnten Primärantikörper inkubiert. Ungebundener Antikörper wurde durch Waschen der Membran in TBS (3x 10 Minuten) entfernt. Anschließend wurde die Membran eine Stunde lang mit den entsprechenden Sekundärantikörpern inkubiert, die 1:5000 in TBS + 3 % Milchpulver verdünnt wurden. Nachdem die Membran wiederum 3 x 10 Minuten in TBS gewaschen wurde, erfolgte die ECL-Detektion (Tessier *et al.*, 1994). Dazu wurde die Membran eine Minute lang mit ECL-Lösung inkubiert. Diese setzt sich aus Lösung A (2,5 mM Luminol, 400 μ M Paracumarsäure, 100 mM Tris-HCl pH 8,5) und Lösung B (5,4 mM H₂O₂, 100 mM Tris-HCl pH 8,5) zusammen, die frisch angesetzt und erst direkt vor der Verwendung vereinigt wurden. Die Detektion der Signale erfolgte durch Exponierung auf einem Fotofilm (HyperfilmTM-ECLTM, AMERSHAM PHARMACIA BIOTECH, Buckinghamshire, GB), bzw. durch den „ChemoCam HR Imager“ (INTAS SCIENCE IMAGING INSTRUMENTS GMBH, Göttingen, D), wobei sich die Dauer der Exponierung nach der Signalstärke richtete.

Um mit der Membran erneut eine Immunodetektion mit einem anderen Antikörper durchzuführen, kann man die Antikörper von der Membran ablösen. Dazu wurde die Membran Trichloressigsäure (3 x 30 Minuten) und anschließend kurz mit TBS-T gewaschen.

5.5.4 Quantifizierung von Immunoblot-Signalen

Die Quantifizierung der Signale erfolgte mit dem Programm LabImage 1D Version 4.1 (KAPLAN BIO-IMAGING GMBH, Leipzig, D). Der Quantifizierungswert (Produkt aus Anzahl und Intensität der Pixel) der Tec1-Bande wurde jeweils durch den Wert des im gleichen Extrakt detektierten Cdc28 Proteins geteilt.

5.5.5 Coomassiefärbung von SDS-Gelen (modifiziert nach Chen et al., 1993)

Das SDS-Gel mit den nach Größe aufgetrennten Proteingemischen wurde dazu in Coomassie Brillant Blau-Lösung (50 % Ethanol, 10 % Essigsäure, 0,05 % Coomassie Brillant Blau) gelegt und für mindestens eine Stunde bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend wurde das Gel mit Entfärbelösung (50 % Ethanol, 10 % Essigsäure) mehrfach gewaschen, bis die Proteinbanden deutlich sichtbar waren. Das gefärbte Gel wurde fotografiert oder eingescannt.

5.5.6 Silberfärbung (modifiziert nach Blum et al., 1987)

Die in einem SDS-Polyacrylamidgel aufgetrennten Proteine (Abschnitt 5.5.2) wurden dazu im Gel fixiert, indem das Gel eine Stunde lang in Fixierlösung (50 % Methanol, 5 % Essigsäure) inkubiert wurde. Danach wurde dreimal mit 50 %-igem Methanol gewaschen und schließlich noch einmal in dH₂O. Die Waschschrte dauerten jeweils 10 Minuten. Durch Inkubation in 0,02 %-iger Natriumthiosulfatlösung für 1 Minute erfolgte die Sensibilisierung. Nach diesem Schritt wurde zweimal kurz mit dH₂O gewaschen, anschließend wurde das Gel 20 Minuten lang in der Silbernitrat-Lösung (0,1 % Silbernitrat, 0,08 % Formalin (37 %)) inkubiert. Wiederum wurde zweimal kurz mit dH₂O gewaschen. Dann wurde das Gel mit Entwicklerlösung (0,2 % Natriumcarbonat, 0,04 % Formalin (37 %)) bedeckt und so lange inkubiert, bis die gewünschte Farbtintensität erreicht war. Die Reaktion wurde durch 5 %-ige Essigsäure gestoppt. Zur Dokumentation konnte das Gel entweder eingescannt oder fotografiert werden.

5.5.7 Photometrischer β -Galaktosidasetest (Rose & Botstein, 1983)

Hefezellen, welche Plasmide mit den zu untersuchenden Konstrukten trugen, wurden über Nacht bei 30 °C in Selektivmedium angezogen. Eine Hauptkultur von 10 ml wurde auf eine OD_{600nm} = 0,2 angeimpft und bis zu einer OD_{600nm} = 1 bei 30 °C inkubiert. Von 5 ml Kultur wurden die Zellen durch Zentrifugation (5 Minuten bei 3000 \times g) geerntet und in Aufbruchpuffer (20 % Glycerin, 100 mM Tris-HCl pH 8,0) gewaschen. Anschließend wurden die Zellen in 250 μ l Aufbruchpuffer mit 1 mM DTT resuspendiert. Durch Zugabe von Glasperlen (\varnothing 0,25–0,50 mm) und Schütteln für 5 Minuten bei 4 °C auf einem Vibrax wurden die Zellen aufgebrochen. Die Zelltrümmer wurden danach durch 15-minütiges Zentrifugieren mit 13000 \times g bei 4 °C pelletiert. Der Überstand wurde quantitativ in eine Mikrotiterplatte mit 96 Vertiefungen (SARSTEDT) überführt und konnte kurzzeitig bis zur weiteren Verwendung bei 4 °C gelagert werden.

Zur quantitativen Bestimmung der β -Galaktosidaseaktivität wurden in einer Mikrotiterplatte 10 μ l der erstellten Proteinextrakte mit 200 μ l Z-Puffer (60 mM Na₂HPO₄, 40 mM NaH₂PO₄, 10 mM KCl, 1 mM MgSO₄) versetzt. Als Reduktionsmittel wurde jeweils frisch 0,25 % (v/v) β -Mercaptoethanol zugesetzt. Der Start der Reaktion wurde durch Zugabe von 40 μ l o-Nitro-

phenol (4 mg/ml in Z-Puffer) ausgelöst. Der Reaktionsansatz wurde bei 30 °C inkubiert, bis eine Gelbfärbung erkennbar war. Durch Zugabe von 100 µl 1 M Na₂CO₃-Lösung wurde die Reaktion abgestoppt, die Reaktionszeit vermerkt und die optische Dichte bei 420 nm gemessen. Parallel wurde die Proteinkonzentration der Proben nach (Bradford, 1976) ermittelt. Die spezifische Aktivität des Proteinextraktes folgt aus:

$$\frac{OD_{420nm} \bullet 0,304}{0,0045 \bullet \text{Proteinkonz. (mg/ml)} \bullet \text{Volumen (ml)} \bullet \text{Reaktionszeit (Min)}}$$

Dabei entspricht die OD_{420nm} der gemessenen Extinktion des Produktes o-Nitrophenol. Der Faktor 0,304 korrigiert das Reaktionsvolumen und der Faktor 0,0045 repräsentiert den Extinktionskoeffizienten von 1 nmol/ml o-Nitrophenol-Lösung.

5.6 Reinigung von Proteinen aus *E. coli*

5.6.1 Heterologe Expression und Affinitätschromatographie von *Tec1*

Die heterologe Expression von MBP-*TEC1*-FLAG-*His*₆ (BHUM 1462), MBP-*TEC1*^{AS 125–240}-FLAG-*His*₆ (BHUM 1925), MBP-*TEC1*^{AS 301–400}-FLAG-*His*₆ (BHUM 1730) und MBP-*TEC1*^{R319A}-FLAG-*His*₆ (BHUM 1669) erfolgte in dem *E. coli*-Stamm BL21 Codon plus (DE3). Eine Vorkultur wurde über Nacht bei 37 °C in LB-Medium mit 1 % Glucose, sowie mit Kanamycin bzw. Ampicillin und Chloramphenicol angezogen. Die Hauptkultur hatte ein Volumen von 500 ml bis 3 L und wurde mit der Vorkultur auf eine OD_{600nm} von 0,1 angeimpft. Bei 20 °C wurde die Kultur bis zu einer OD_{600nm} von 0,5 inkubiert. Dann erfolgte die Induktion der Expression durch Zugabe von 0,5 mM IPTG. Nach 4 Stunden bei 20 °C wurden die Zellen auf Eis gekühlt und durch Zentrifugation (15 Minuten bei 5000 × g und 4 °C) pelletiert. Anschließend wurden die Zellen in Bindepuffer gewaschen (500 mM NaCl, 10 mM EDTA, 50 mM Tris pH 7,5). Nun wurden die Zellen in 30 ml Bindepuffer resuspendiert und 1 mM DTT, sowie 1 mM PMSF als Proteaseinhibitor hinzugefügt. Der Zellaufschluss erfolgte mit einer French Press-Zelle, bei der die Zellsuspension dreimal bei einem Druck von 1000 psi durch eine schmale Öffnung gepresst wurde. Die Zelltrümmer wurden durch Zentrifugation mit einer Ultrazentrifuge (BECKMAN COULTER INC., Brea, CA, USA) bei 23000 × g für 1 Stunde bei 4 °C sedimentiert. Der Überstand wurde für die Reinigung über eine Affinitätssäule mit Amylose-Resin verwendet. Das Säulenmaterial hatte ein Volumen von ca. 1,4 ml und wurde mit Bindepuffer äquilibriert. Danach wurde die Proteinlösung schrittweise auf die Säule gegeben. Die Durchflussgeschwindigkeit wurde durch die Gravitation bestimmt und betrug ca. 5–10 Minuten/ml. Mit Bindepuffer, dem DTT und PMSF zugesetzt waren, wurde die Säule anschließend gewaschen. Die Elution der gebundenen Proteine erfolgte in 10 Schritten mit je 1 ml Säulenpuffer plus 10 mM Maltose und 1 mM DTT. Durch SDS-Gelelektrophorese und

anschließende Färbung der aufgetrennten Proteine mit Coomassie Blue (siehe Abschnitt 5.5.5) wurde Konzentration und Reinheit der Eluate überprüft und schließlich die Eluate mit den höchsten Konzentrationen vereinigt.

Da das gereinigte Protein viele Abbruchfragmente aufwies, wurde eine zweite Affinitätsreinigung über den 6xHis-Tag am C-terminalen Ende von Tec1 durchgeführt. Dazu musste die Proteinlösung zunächst dialysiert werden, um das im Puffer enthaltene EDTA zu entfernen. Die Proteinlösung wurde dazu in einen Dialyseschlauch gefüllt, der an beiden Enden mit Klammern verschlossen wurde. Dieser wurde dann in 2 L Dialysepuffer (50 mM Tris HCl pH 7,5, 500 mM NaCl) gelegt und über Nacht bei 4 °C inkubiert.

Die Affinitätsreinigung mit dem 6xHis-Tag erfolgte mit Hilfe von Nickel-Resin. Diese wurde in Nickel Puffer 2 (25 mM Tris HCl pH 7,5, 500 mM NaCl) äquilibriert und anschließend eine Stunde lang mit der dialysierten Proteinlösung bei 4 °C inkubiert. Anschließend wurde fünfmal mit Nickel Puffer 2 gewaschen. Es folgte die Elution der Proteine mit Elutionspuffer (25 mM Tris HCl pH 7,5, 500 mM NaCl, 500 mM Imidazol). Die Konzentration der Eluate wurde mit Hilfe des NanoDrop-Spektrometers bestimmt, wobei Größe und Extinktionskoeffizient des Fusionsproteins in die Messung einbezogen wurden. Schließlich wurden die am höchsten konzentrierten Eluate vereinigt, mit einer Endkonzentration von 50 % Glycerin versetzt und in Aliquots bei –80°C eingefroren.

5.6.2 Heterologe Expression und Affinitätschromatographie von Karyopherinen mit GST-Tag

Die in den Vektor pGEX klonierten Karyopheringene wurden in dem *E. coli* Expressionsstamm KRX exprimiert (BHUM 1228, 1229, 1230, 1231, 1232, 1233, 1234, 1235, 1236, 1237, 1238, 1239, 1240, 1241). Dazu wurde über Nacht eine Vorkultur in LB-Medium mit Ampicillin angezogen, mit der dann eine Hauptkultur im gleichen Medium auf eine OD_{600nm} von 0,1 angeimpft wurde. Diese wurde 3 Stunden lang bei 37 °C inkubiert und dann mit 0,1 mM IPTG die Proteinexpression induziert. Für weitere drei Stunden wurde die Kultur bei 37 °C inkubiert. Anschließend wurden die Zellen auf Eis gekühlt und durch Zentrifugation (5000 × g, 15 Minuten 4 °C) pelletiert. Die Zellen wurden mit Wasser gewaschen und bis zur Verwendung bei –80°C eingefroren.

Die Affinitätsreinigung über den GST-Tag erfolgte mit Glutathion-Sepharose 4B, welche mit STE-Puffer (10 mM Tris pH 8,0, 150 mM NaCl, 1 mM EDTA) äquilibriert wurde. Die Zellen wurden in 10 ml STE-Puffer resuspendiert und folgende Komponenten hinzugefügt: 125 µg Lysozym, 5 mM DTT, 1 mM PMSF, 4 Units DnaseI und 3 mM EDTA. Der Zellaufschluss erfolgte mit einer French-Press-Zelle und das Lysat wurde mit einer Ultrazentrifuge (BECKMAN COULTER INC., Brea, CA, USA) bei 23000 × g für 1 Stunde bei 4 °C sedimentiert. Der

Überstand wurde in ein neues Gefäß gegeben, mit 1 % Triton X-100 versetzt und für 10 Minuten bei 4 °C rotierend inkubiert. Das Lysat wurde dann mit 400 µl äquilibrierter Glutathion-Sepharose für 1–2 Stunden inkubiert. Anschließend wurde die Sepharose dreimal mit 10 ml STE-Puffer gewaschen. Zur Elution der Proteine wurde je 250 µl Elutionspuffer (50 mM Tris HCl pH 8,0, 50 mM NaCl, 5 mM DTT, 10 mM reduziertes Glutathion, pH 8,0) zugegeben und 10 Minuten bei 4 °C rollend inkubiert. Nach einer Zentrifugation (eine Minute bei 2000 x g) wurde der Überstand in ein neues Gefäß gegeben und die Elution 2–3 mal wiederholt. Die Konzentration der Eluate wurde mit dem NanoDrop-Spektrometer bestimmt, wobei Größe des Fusionsproteins und Extinktionskoeffizient berücksichtigt wurden. Die am höchsten konzentrierten Eluate wurden vereinigt und Glycerin in einer Endkonzentration von 50 % zugegeben. Die Proteine wurden bei –80 °C eingefroren.

5.6.3 Heterologe Expression und Affinitätschromatographie von 6xHis-Gsp1^{Q71L}

Das mit einem His-Tag markierte Protein Gsp1^{Q71L} (BHUM 1227) wurde in dem *E. coli*-Stamm KRX exprimiert. Dazu wurde eine Vorkultur über Nacht bei 37 °C in LB-Medium mit Ampicillin herangezogen, womit am nächsten Tag eine Hauptkultur von 500 ml des gleichen Mediums auf eine OD_{600nm} von 0,1 angeimpft wurde. Diese wurde 3 Stunden lang bei 37 °C inkubiert und dann mit 0,1 mM IPTG für 3 Stunden ebenfalls bei 37 °C inkubiert. Anschließend wurden die Zellen auf Eis gekühlt, durch Zentrifugation (5000 x g, 15 Minuten, 4 °C) geerntet und mit Nickel Puffer 1 (25 mM Tris HCl pH 7,5) gewaschen. Das Pellet wurde in 10 ml Nickel Puffer 2 (25 mM Tris HCl pH 7,5, 500 mM NaCl) resuspendiert, dem 1 mM PMSF zugefügt wurde. Die Zellen wurden mit einer French-Press-Zelle aufgeschlossen und das Lysat durch Zentrifugation mit einer Ultrazentrifuge (BECKMAN COULTER INC., Brea, CA, USA) bei 23000 x g für eine Stunde bei 4 °C sedimentiert. Nickel-Agarose wurde in Nickel Puffer 2 äquilibriert und 100 µl der Agarose mit dem Lysat eine Stunde lang bei 4 °C rollend inkubiert. Anschließend wurde die Sepharose einmal mit Nickel Puffer 2 und zweimal mit Nickel Puffer 3 (25 mM Tris HCl pH 7,5, 500 mM NaCl, 10 mM Imidazol, 0,1 % Triton X-100) gewaschen. Zum eluieren wurde Nickel Puffer 4 (25 mM Tris HCl pH 7,5, 500 mM NaCl, 1 M Imidazol) verwendet. Nach einer Inkubation bei 4 °C für 20 Minuten wurde die Nickel-Agarose durch Zentrifugation (eine Minute, 2000 x g) sedimentiert und der Überstand in ein neues Gefäß gegeben. Die Elution wurde 2–3 mal wiederholt. Die Konzentration wurde mit dem NanoDrop-Spektrometer gemessen. Um nukleotidfreies Gsp1 zu bekommen, wurde das gereinigte Protein mit Dialysepuffer (20 mM HEPES pH 7,2 + 10 mM EDTA + 2 mM MgCl) über Nacht dialysiert. Die Konzentration wurde erneut gemessen.

5.6.4 Beladung von His₆-Gsp1^{Q71L} mit GTP (Clement *et al.*, 2006)

Um das gereinigte His₆-Gsp1^{Q71L} mit GTP zu beladen, wurden folgende Komponenten zu dem Protein gegeben: 30 mM HEPES pH 7,2, 2 mM GTP pro 20 µM Gsp1^{Q71L}, 10 mM EDTA (pH 8). Der Ansatz wurde eine Stunde lang auf Eis inkubiert und anschließend 15 Minuten bei Raumtemperatur. Durch Zugabe von 20 mM Mg(OAc)₂ wurde die Reaktion gestoppt und nach weiteren 30 Minuten auf Eis wurde der Ansatz aliquotiert und in flüssigem Stickstoff schockgefroren. Die Lagerung erfolgte bei -80 °C. Die Mutation von Glutamin an der Position 71 zu Leucin in dem Protein Gsp1 bewirkt, dass die GTPase-Aktivität deutlich verringert wird (Frech *et al.*, 1994; Klebe *et al.*, 1995; Maurer *et al.*, 2001).

5.7 *In vitro* Interaktionstest von Proteinen

5.7.1 Variante 1 – mit Amylose Resin

Für die *in vitro*-Interaktionstests zwischen Tec1 und den Karyopherinen, wurde gereinigtes MBP-Tec1-His₆, MBP-Tec1^{R319A}-His₆, MBP-Tec1^{AS 125–240}-His₆ bzw. MBP-Tec1^{AS 301–400}-His₆ (siehe Abschnitt 5.6.1) und gereinigte GST-markierte Karyopherine (siehe Abschnitt 5.6.2) verwendet. Jeweils 50 µl Amylose Resin wurde mit Universal Puffer (20 mM HEPES pH 7,2, 100 mM KAc, 2 mM MgAc, 0,1 % Tween 20 und 10 % Glycerin) äquilibriert und mit 1 µg MBP-Tec1 oder MBP-Tec1^{R319A} bzw. 2,5 µg MBP-Tec1^{AS 125–240} oder MBP-Tec1^{AS 301–400} für eine Stunde bei 4 °C rotierend inkubiert. Der Ansatz wurde mit Universal Puffer auf ein Gesamtvolumen von 200 µl gebracht. Nach der Inkubation wurde das ungebundene MBP-Tec1 Protein durch zwei Waschschrte mit je 1 ml Universal Puffer entfernt. Als nächstes wurde 1 µg gereinigtes GST-Karyopherin mit der Amylose Resin inkubiert (2 Stunden bei 4 °C, rotierend). Der Ansatz hatte ein Gesamtvolumen von 400 µl und wurde ebenfalls mit Universal Puffer angesetzt. Bei den Interaktionstests von MBP-Tec1 mit den Exportinen wurde dem Ansatz 14 µg gereinigtes und mit GTP beladenes Gsp1-His₆ hinzugefügt. Nach der Inkubation wurden 350 µl des Überstandes in ein neues Reaktionsgefäß überführt und durch Zugabe von 70 µl 55 %-ige Trichloressigsäure die darin enthaltenen Proteine gefällt. Durch Zentrifugation (10 Minuten bei 13000 × g) wurden die Proteine pelletiert und nach einem Waschschrte mit Aceton das getrocknete Pellet in 50 µl SDS-Probenpuffer (0,25 M Tris HCl pH 6,8, 15 % β-Mercaptoethanol, 30 % Glycerin, 7 % SDS und 0,3 % Bromphenolblau) resuspendiert (= Probe Überstand). Die Amylose Resin mit den daran gebundenen Proteinen wurde dreimal mit je 1 ml Universal Puffer gewaschen und die Kügelchen anschließend mit 60 µl SDS-Probenpuffer versetzt (= Probe Pulldown). Beide Proben (Überstand und Pulldown) wurden 5 Minuten lang bei 50 °C erwärmt und anschließend zentrifugiert (10 Minuten bei 13000 × g).

Jeweils 10 µl der Proben wurden auf ein SDS-Polyacrylamidgel aufgetragen und die Proteine bei einer Spannung von 200 V 35 Minuten lang im elektrischen Feld aufgetrennt. Anschließend wurden die Proteine durch eine Silberfärbung sichtbar gemacht (siehe Abschnitt 5.5.6).

Als Kontrollen der Interaktionstests wurde einerseits nach der oben beschriebenen Vorgehensweise mit MBP-Tec1 (1 µg), MBP-Tec1^{AS 125–240} (2,5 µg) bzw. MBP-Tec1^{AS 301–400} (2,5 µg) beladene Amylose Resin mit jeweils 1 µg unfusioniertem GST inkubiert. Andererseits wurde getestet, ob mit 2,5 µg MBP beladene Amylose Resin mit den GST-Karyopherinen interagiert. Und schließlich wurde jedes GST-Karyopherin (1 µg) auf die Interaktion mit 50 µl Amylose Resin (ohne MBP-Protein) untersucht.

5.7.2 Variante 2 – mit Glutathion-Sephrose (nach Fries et al., 2007)

Für den in Abb. 2.26 gezeigten Interaktionstest zwischen MBP-Tec1 und GST-Pse1 wurde die folgende Methode angewandt: Pro Reaktionsansatz wurden 15 µl Glutathion-Sephrose mit Universal Puffer (20 mM HEPES pH 7,2, 100 mM KAc, 2 mM MgAc, 0,1 % Tween 20 und 10 % Glycerin) äquilibriert. Diese wurde mit je 12 µg gereinigtem GST-Pse1 in einem Gesamtvolumen von 200 µl für 1 Stunde bei 4 °C rotierend inkubiert. Die Sepharosekügelchen wurden anschließend dreimal mit je 1 ml Universal Puffer gewaschen. Dann wurde 3 µg gereinigtes MBP-Tec1 mit der Sepharose inkubiert (Gesamtvolumen von 200 µl). Nach einer Stunde bei 4 °C wurden die Kügelchen erneut dreimal mit je 1 ml Universal Puffer gewaschen. Der dritte Inkubationsschritt war mit 26 µg Gsp1GTP bzw. als Kontrolle mit dem für die GTP-Beladung von Gsp1 verwendeten Puffer (30 mM HEPES pH 7,2, 2 mM GTP pro 20 µM Gsp1, 10 mM EDTA (pH 8) und 20 mM Mg(OAc)₂) inkubiert. Das Volumen der Reaktionsansätze wurde jeweils mit Universal Puffer auf 200 µl aufgefüllt. Nach einer einstündigen Inkubation bei 4 °C wurde die Sepharose erneut wie oben beschrieben gewaschen und anschließend mit 50 µl SDS-Probenpuffer (0,25 M Tris HCl pH 6,8, 15 % β-Mercaptoethanol, 30 % Glycerin, 7 % SDS und 0,3 % Bromphenolblau) versetzt. Die Proben wurden 10 Minuten bei 100 °C erhitzt und bei 13000 rpm für 10 Minuten zentrifugiert. Jeweils 15 µl der Proben wurden auf ein SDS-Polyacrylamid-Gel aufgetragen und für 60 Minuten bei 170 Volt aufgetrennt. Es folgte ein Immunoblot mit Antikörpern gegen MBP und gegen GST (siehe Abschnitt 5.5.3).

5.8 In vitro Interaktionstest von Proteinen mit DNA – Elektrophoretischer Mobilitäts-Shift-Assay (EMSA)

5.8.1 Expression von MBP-TEC1-FLAG in E. coli

Der *E. coli*-Stamm BL21(DE3)-Star™-pLysS wurde mit Expressionsplasmiden transformiert, welche MBP-TEC1 bzw. MBP-TEC1-Varianten enthalten. Die Zellen wurden in einer Vorkultur aus LB mit Ampicillin und Chloramphenicol bei 37 °C über Nacht angezogen. Eine 100 ml-

Hauptkultur (LB mit Ampicillin und Chloramphenicol) wurde mit der Vorkultur auf eine $OD_{600nm} = 0,1$ beimpft und bei 30 °C schüttelnd bis $OD_{600nm} = 0,3$ sowie anschließend bei 20 °C bis zu einer OD_{600nm} von 0,5 inkubiert. Die Induktion der Expression von *MBP-TEC1* erfolgte durch Zugabe von 0,3 mM IPTG für 4 h bei 20 °C. Danach wurden die Zellen für 15 Minuten bei 5000 rpm und 4 °C pelletiert und bei –20 °C gelagert.

5.8.2 Herstellung von Proteinextrakten aus *E. coli*

Das Zellpellet wurde auf Eis aufgetaut und in 2 ml Bindepuffer (10 mM Tris pH 7,5, 50 mM NaCl, 0,1 mM EDTA) resuspendiert. Nach Zugabe von 20 µl 0,1 M PMSF und 50 µl Lysozym (12 mg/ml) wurde der Ansatz 15 Minuten bei Raumtemperatur und anschließend eine Stunde auf Eis inkubiert. Die Zelltrümmer wurden durch Zentrifugation (1 Stunde bei 13000 x g und 4 °C) pelletiert und das Zelllysate in ein neues Gefäß überführt.

5.8.3 Gelretardierungsexperiment (EMSA)

Um die Bindung von MBP-Tec1 an die TCS-Elemente der DNA zu untersuchen, wurde die Veränderung Laufverhaltens eines doppelsträngigen DNA-Oligonukleotids nach Protein-Bindung in einer nativen Polyacrylamid-Gelelektrophorese untersucht. Als DNA-Sonde wurden die hybridisierten komplementären Oligonukleotide BHTCS1_1 und BHTCS1_2 eingesetzt, welche die zu untersuchende Bindestelle enthielten. BHTCS1_1 war mit dem Fluorophor „Cyber 5“ (Cy5) markiert. Zu 2 µl dieses doppelsträngigen Oligonukleotids (ca. 20 fmol/µl) wurden 2,5 µl 10x Bindepuffer (100 mM Tris pH 7,5, 500 mM NaCl, 1 mM EDTA), 0,4 µl DTT, 2 µl BSA, 2 µl Poly(dI-dC) (1:10), 1 µl „Complete Protease Inhibitor Cocktail“ (ROCHE GMBH, Mannheim, D), 12,1 µl H₂O und 3 µl Proteinextrakt (1 mg/ml) gegeben. Der Ansatz wurde 30 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert, anschließend mit 5 µl Ladepuffer (50 % Glycerin, 25 mM Tris pH 7,5, 50 mM NaCl, 1 mM EDTA) versetzt und auf ein nicht denaturierendes 6 %-iges Polyacrylamidgel (30 % Acrylamid/0,8 % N,N'-Methylen-bisacrylamid, 10x TBE pH 8,3 (1 M Tris Base, 1 M Borsäure, 0,025 EDTA), 10 % Ammoniumpersulfat, 1 % TEMED) aufgetragen. Zunächst wurde für 5 Minuten eine Spannung von 150 V angelegt und anschließend wurden die Proben 1,5 Stunden bei 110 V aufgetrennt. Das Gel wurde mit dem „TyphoonTM Variable Mode Imager 9400“ (GE HEALTHCARE, München, D) bei 633 nm eingescannt. Bei dieser Wellenlänge kam es zur Anregung des Cy5-Fluoreszenzfarbstoffs, wodurch die Position der Oligonukleotide im Gel bestimmt werden konnte. Die proteingebundene DNA hatte eine geringere elektrophoretische Mobilität durch das höhere Molekulargewicht und die geringere relative Ladung pro Masseinheit. Im Vergleich zum freien DNA-Oligonukleotid kommt es im Gel zu einem verzögerten Laufverhalten (Gelretardation). Die Quantifizierung der Signale erfolgte mit dem Programm ImageJ (<http://rsbweb.nih.gov/ij/>) (Rasband, 1997). Dazu wurde in jeder Spur die Signalstärke der

freien DNA, sowie der proteingebundenen DNA gemessen und der Quotient aus gebundener DNA zu Gesamt-DNA (freie DNA + gebundene DNA) gebildet. Um die relative Bindeaktivität zu errechnen, wurde der Wert für das Wildtyp-Protein gleich 100 % gesetzt und die anderen Werte relativ zu dem des Wildtyps berechnet.

5.9 Mikroskopie

5.9.1 Fluoreszenzmikroskopie

Hefezellen, die GFP-markiertes Tec1 herstellten, wurden in Minimalmedium, das eine geringe Eigenfluoreszenz hat, herangezogen. Dieses Medium setzte sich wie folgt zusammen: 5 g/l $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, 1 g/l KH_2PO_4 , 0,5 g/l MgSO_4 , 0,1 g/l NaCl , 0,1 g/l Ca_2Cl , 0,5 mg/l H_3BO_4 , 0,04 mg/l CuSO_4 , 0,1 mg/l KI , 0,2 mg/l FeCl_3 , 0,4 mg/l MnSO_4 , 0,2 mg/l Na_2MoO_4 , 0,4 mg/l ZnSO_4 , 2 $\mu\text{g/l}$ Biotin, 0,4 mg/l Kalzium Pantothenat, 2 mg/l Inositol, 0,4 mg/l Niacin, 0,2 mg/l para-Aminobenzoat, 0,4 mg/l Pyridoxin HCl, 0,4 mg/l Thiamin (nach Sheff & Thorn, 2004).

Von den zu untersuchenden Zellen wurde eine Übernachtskultur angesetzt, mit der am nächsten Morgen eine Hauptkultur von 5 ml auf eine $\text{OD}_{600\text{nm}}$ von ca. 0,2 angeimpft wurde. Die Zellen bei 30 °C inkubiert, bis zu einer $\text{OD}_{600\text{nm}}$ von ca. 0,8–1,0. Zum Mikroskopieren wurden 5 μl der Zellsuspension auf mit Agarose beschichtete Objektträger getropft. Alternativ wurden die Zellen in Mikroskop-Schälchen mit Glasboden mikroskopiert. Dazu wurde die Glasoberfläche im Inneren des Schälchens mit 0,1 %-iger Concanavalin A-Lösung beschichtet und 5–10 Minuten lang inkubiert. Danach wurde die Lösung mit der Pipette wieder abgezogen und die Oberfläche mit Wasser gewaschen. Nun wurden 200 μl der Zellsuspension aufgetropft und nach einer Minute wieder abgenommen. Eine gewisse Anzahl an Zellen hat sich in dieser Zeit am Boden abgesetzt und wird von dem Concanavalin A gebunden. Zum Schluss wurde der Boden des Schälchens mit 3 ml Medium bedeckt.

Mikroskopiert wurde mit dem Fluoreszenzmikroskop Axiovert 200M (ZEISS, Oberkochen, D) an das eine Kamera des Typs HAL 100 (HAMAMATSU) angeschlossen war. Die verwendete Software war „Velocity 5“ (IMPROVISION, Tübingen, D). Es wurde das Objektiv mit der 100x Vergrößerung verwendet, welches eine Ölimmersion erfordert. Die Belichtungszeiten richteten sich nach der Fluoreszenzintensität der einzelnen Fusionsproteine und lagen zwischen 10 ms und 1 s.

Um das Verhältnis von im Zellkern befindlichem zu im Zytoplasma lokalisiertem GFP-markierten Protein zu bestimmen, wurden die Fluoreszenzintensitäten mit dem Programm „ImageJ“ (<http://rsbweb.nih.gov/ij/>) (Rasband, 1997) quantifiziert. Dazu wurde eine kreisförmige Region im Zellkern ausgewählt und die Intensität und Anzahl der Pixel vom Programm berechnen lassen. Eine weitere Region wurde im Zytoplasma der gleichen Zelle gewählt und die gleiche Messung durchgeführt. Von beiden Werten wurde der Wert der

Eigenfluoreszenz von Zellen, die kein GFP exprimieren, abgezogen. Der Quotient $R = (N - C) / (N + C) \times 100$ wurde schließlich gebildet, bei dem N die Fluoreszenz im Kern und C diejenige im Zytoplasma ist (Leclerc *et al.*, 1998). Die Werte des Quotienten R liegen zwischen -100 und +100. Es wurden jeweils die Signale von 50–100 Zellen quantifiziert.

5.9.2 „Fluorescence Recovery after Photobleaching“ (FRAP)

Für die FRAP-Analysen wurde das Konfokale Laser Scanning Mikroskop „TCS SP5“ mit der Software „LAS AF“ inklusive des „FRAP-Wizard“ verwendet (beides von der Firma LEICA MIKROSYSTEME GMBH (Wetzlar, D)). Der Argon-Laser wurde auf die Wellenlänge $\lambda = 495\text{--}530\text{ nm}$, die Frequenz auf 1400 Hz und die Lochblende auf die Einheit 2 AU (airy units) eingestellt. Der Bereich des Zellkerns, der gebleicht werden sollte, wurde jeweils am Bildschirm mit Hilfe des Auswahlwerkzeuges markiert. Zunächst wurden drei Bilder im zeitlichen Abstand von ca. 0,4 Sekunden aufgenommen, dann erfolgte das Bleichen der ausgewählten Region mit einer Laserstärke von 70 % innerhalb von 0,8 Sekunden. Anschließend wurden 240 Bilder im Abstand von 0,4 Sekunden aufgenommen, was einem Zeitraum von ca. 96 Sekunden entspricht. Die Quantifizierung der Fluoreszenz-Wiederkehr im Zellkern wurde mit der Software ImageJ (<http://rsbweb.nih.gov/ij/>) (Rasband, 1997) durchgeführt. Dazu wurde die Region der Zelle, die gebleicht wurde, ausgewählt und die Fluoreszenzintensität in diesem Bereich in allen 245 Bildern gemessen. Um das in der ganzen Zelle über den Zeitraum der Bildaufnahme auftretende Ausbleichen der Fluoreszenz bei der Auswertung zu berücksichtigen, wurde außerdem die Fluoreszenzintensität der ganzen Zelle in allen Bildern gemessen. Von beiden Messreihen (Fluoreszenz im Kern und Fluoreszenz der gesamten Zelle) wurde jeweils der erste Wert (vor dem Bleichen) auf 100 % gesetzt und für die anderen Werte relativ dazu berechnet. Schließlich wurden die Werte der Fluoreszenz im Kern durch die entsprechenden Werte der Fluoreszenz der Gesamtzelle geteilt und mit 100 multipliziert. Von den Zellen, die nur GFP exprimierten, wurden jeweils drei Zellen gemessen, von denen mit GFP-Tec1^{AS 125–240} (BHUM 1415) bzw. GFP-Tec1^{AS 301–400} (BHUM 1418) jeweils 7–11 Zellen. Die Mittelwerte der aus den einzelnen Messungen erhaltenen Werte wurden gebildet und daraus ein Graph erstellt, bei dem die relative Fluoreszenz (y-Achse) gegen die Zeit (x-Achse) aufgetragen ist. Um die prozentuale Regeneration der Fluoreszenz auszurechnen, wurde für jede Zelle die Differenz zwischen Fluoreszenz zum Zeitpunkt $t = 97,2\text{ s}$ (letztes Bild der Messreihe) und $t = 1,6\text{ s}$ (direkt nach Bleichen des Kerns) bestimmt ($\Delta R(\%)$). Da die Zellkerne der verschiedenen Zellen unterschiedlich stark gebleicht wurden, wurden die Werte mit folgender Formel ausgerechnet, wobei die Zahl 35 dem niedrigsten Wert für $t = 1,6\text{ s}$ von allen gemessenen Zellen ist, auf den alle anderen Werte abgestimmt wurden:

$$\Delta R(\%) = \frac{35\%}{t_{=1,6s}(\%)} \cdot t_{=97,2s}(\%) - 35\%$$

5.10 Tropftest

Zum Vergleich des Wachstumsverhaltens verschiedener Stämme auf unterschiedlichen Medien wurde ein Tropftest durchgeführt. Hierzu wurden die Stämme in Flüssigmedium (YPD) bis zur exponentiellen Phase herangezogen. Von den Kulturen wurden serielle Verdünnungen hergestellt und gleiche Zellmengen auf Festmedium aufgetropft. Nach einer Inkubation von drei Tagen bei 30 °C wurde das Wachstum der Stämme verglichen.

5.11 Statistik

5.11.1 Korrelationskoeffizient nach Pearson

Der Korrelationskoeffizient nach Pearson ist ein dimensionsloses Maß für den linearen Zusammenhang zwischen zwei quantitativen Größen. Die Berechnung erfolgt durch folgende Formel:

$$r = \frac{s_{xy}}{s_x \bullet s_y} = \frac{\sum_{i=1}^n (x_i - \bar{x})(y_i - \bar{y})}{\sqrt{\sum_{i=1}^n (x_i - \bar{x})^2 \sum_{i=1}^n (y_i - \bar{y})^2}}$$

s_{xy} ist die empirische Kovarianz, s_x und s_y die empirischen Standardabweichungen, \bar{x} und \bar{y} die Mittelwerte der zu korrelierenden Größen x und y , sowie n die Anzahl der Wertepaare (x_i, y_i) (<http://www.medi-stat.de/statistik-lexikon-medizin-pearson-korrelation.html>).

6. Literatur

- Aitchison JD, Blobel G & Rout MP (1996)** Kap104p: a karyopherin involved in the nuclear transport of messenger RNA binding proteins. *Science* **274**: 624-627.
- Akey CW (1995)** Structural plasticity of the nuclear pore complex. *J Mol Biol* **248**: 273-293.
- Akhtar A & Gasser SM (2007)** The nuclear envelope and transcriptional control. *Nat Rev Genet* **8**: 507-517.
- Alber F, Dokudovskaya S, Veenhoff LM, et al. (2007)** The molecular architecture of the nuclear pore complex. *Nature* **450**: 695-701.
- Albertini M, Pemberton LF, Rosenblum JS & Blobel G (1998)** A novel nuclear import pathway for the transcription factor TFIIS. *J Cell Biol* **143**: 1447-1455.
- Allen NP, Huang L, Burlingame A & Rexach M (2001)** Proteomic analysis of nucleoporin interacting proteins. *J Biol Chem* **276**: 29268-29274.
- Anbanandam A, Albarado DC, Nguyen CT, Halder G, Gao X & Veeraraghavan S (2006)** Insights into transcription enhancer factor 1 (TEF-1) activity from the solution structure of the TEA domain. *Proc Natl Acad Sci USA* **103**: 17225-17230.
- Andrade MA & Bork P (1995)** HEAT repeats in the Huntington's disease protein. *Nat Genet* **11**: 115-116.
- Andrianopoulos A & Timberlake WE (1991)** ATTS, a new and conserved DNA binding domain. *Plant Cell* **3**: 747-748.
- Andrianopoulos A & Timberlake WE (1994)** The *Aspergillus nidulans abaA* gene encodes a transcriptional activator that acts as a genetic switch to control development. *Mol Cell Biol* **14**: 2503-2515.
- Arnold K, Bordoli L, Kopp J & Schwede T (2006)** The SWISS-MODEL workspace: a web-based environment for protein structure homology modelling. *Bioinformatics* **22**: 195-201.
- Arts GJ, Fornerod M & Mattaj JW (1998)** Identification of a nuclear export receptor for tRNA. *Curr Biol* **8**: 305-314.
- Bachmair A, Finley D & Varshavsky A (1986)** In vivo half-life of a protein is a function of its amino-terminal residue. *Science* **234**: 179-186.
- Bakhrat A, Baranes-Bachar K, Reshef D, Voloshin O, Krichevsky O & Raveh D (2008)** Nuclear export of Ho endonuclease of yeast via Msn5. *Curr Genet* **54**: 271-281.
- Bakhrat A, Baranes K, Krichevsky O, Rom I, Schlenstedt G, Pietrokovski S & Raveh D (2006)** Nuclear import of ho endonuclease utilizes two nuclear localization signals and four importins of the ribosomal import system. *J Biol Chem* **281**: 12218-12226.
- Banuett F (1992)** *Ustilago maydis*, the delightful blight. *Trends Genet* **8**: 174-178.
- Banuett F (1995)** Genetics of *Ustilago maydis*, a fungal pathogen that induces tumors in maize. *Annu Rev Genet* **29**: 179-208.
- Baur M, Esch RK & Errede B (1997)** Cooperative binding interactions required for function of the Ty1 sterile responsive element. *Mol Cell Biol* **17**: 4330-4337.
- Beals CR, Clipstone NA, Ho SN & Crabtree GR (1997)** Nuclear localization of NF-ATc by a calcineurin-dependent, cyclosporin-sensitive intramolecular interaction. *Genes Dev* **11**: 824-834.
- Beck M, Forster F, Ecke M, et al. (2004)** Nuclear pore complex structure and dynamics revealed by cryoelectron tomography. *Science* **306**: 1387-1390.
- Belhumeur P, Lee A, Tam R, DiPaolo T, Fortin N & Clark MW (1993)** *GSP1* and *GSP2*, genetic suppressors of the prp20-1 mutant in *Saccharomyces cerevisiae*: GTP-

binding proteins involved in the maintenance of nuclear organization. *Mol Cell Biol* **13**: 2152-2161.

Bembenek J, Kang J, Kurischko C, et al. (2005) Crm1-mediated nuclear export of Cdc14 is required for the completion of cytokinesis in budding yeast. *Cell Cycle* **4**: 961-971.

Bharucha N, Ma J, Dobry CJ, Lawson SK, Yang Z & Kumar A (2008) Analysis of the yeast kinome reveals a network of regulated protein localization during filamentous growth. *Mol Biol Cell* **19**: 2708-2717.

Birnboim HC & Doly J (1979) A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA. *Nucleic Acids Res* **7**: 1513-1523.

Bischoff FR & Ponstingl H (1991) Catalysis of guanine nucleotide exchange on Ran by the mitotic regulator RCC1. *Nature* **354**: 80-82.

Bischoff FR, Scheffzek K & Ponstingl H (2002) How Ran is regulated. *Results Probl Cell Differ* **35**: 49-66.

Bischoff FR, Klebe C, Kretschmer J, Wittinghofer A & Ponstingl H (1994) RanGAP1 induces GTPase activity of nuclear Ras-related Ran. *Proc Natl Acad Sci USA* **91**: 2587-2591.

Bischoff FR, Krebber H, Kempf T, Hermes I & Ponstingl H (1995) Human RanGTPase-activating protein RanGAP1 is a homologue of yeast Rna1p involved in mRNA processing and transport. *Proc Natl Acad Sci USA* **92**: 1749-1753.

Blondel M, Alepuz PM, Huang LS, Shaham S, Ammerer G & Peter M (1999) Nuclear export of Far1p in response to pheromones requires the export receptor Msn5p/Ste21p. *Genes Dev* **13**: 2284-2300.

Blum H, Beier H & Gross H (1987) Improved silver staining of plant proteins, RNA and DNA in polyacrylamide gels. *Electrophoresis* **8**: 93-99.

Boehm U, Heinlein M, Behrens U & Kunze R (1995) One of three nuclear localization signals of maize Activator (Ac) transposase overlaps the DNA-binding domain. *Plant J* **7**: 441-451.

Bogerd HP, Fridell RA, Benson RE, Hua J & Cullen BR (1996) Protein sequence requirements for function of the human T-cell leukemia virus type 1 Rex nuclear export signal delineated by a novel in vivo randomization-selection assay. *Mol Cell Biol* **16**: 4207-4214.

Bohnsack MT, Regener K, Schwappach B, Saffrich R, Paraskeva E, Hartmann E & Görlich D (2002) Exp5 exports eEF1A via tRNA from nuclei and synergizes with other transport pathways to confine translation to the cytoplasm. *EMBO J* **21**: 6205-6215.

Bonner WM (1975) Protein migration into nuclei. I. Frog oocyte nuclei in vivo accumulate microinjected histones, allow entry to small proteins, and exclude large proteins. *J Cell Biol* **64**: 421-430.

Bosshard HR (2001) Molecular recognition by induced fit: how fit is the concept? *News Physiol Sci* **16**: 171-173.

Boustany LM & Cyert MS (2002) Calcineurin-dependent regulation of Crz1p nuclear export requires Msn5p and a conserved calcineurin docking site. *Genes Dev* **16**: 608-619.

Bradford M (1976) A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* **72**: 248-254.

Brückner S (2002) Isolierung neuer Interaktionspartner von Tec1p aus *Saccharomyces cerevisiae*. *Diplomarbeit*.

- Brückner S (2007)** Regulation des TEA/ATTS-Transkriptionsfaktors Tec1 durch die Pheromon-induzierte MAPK-Kaskade und den TOR-Signalweg in *Saccharomyces cerevisiae*. *Dissertation*.
- Brückner S, Köhler T, Braus GH, Heise B, Bolte M & Mösch HU (2004)** Differential regulation of Tec1 by Fus3 and Kss1 confers signaling specificity in yeast development. *Curr Genet* **46**: 331-342.
- Bürglin TR (1991)** The TEA domain: a novel, highly conserved DNA-binding motif. *Cell* **66**: 11-12.
- Cadepond F, Gasc JM, Delahaye F, et al. (1992)** Hormonal regulation of the nuclear localization signals of the human glucocorticosteroid receptor. *Exp Cell Res* **201**: 99-108.
- Caesar S, Greiner M & Schlenstedt G (2006)** Kap120 functions as a nuclear import receptor for ribosome assembly factor Rpf1 in yeast. *Mol Cell Biol* **26**: 3170-3180.
- Campbell S, Inamdar M, Rodrigues V, Raghavan V, Palazzolo M & Chovnick A (1992)** The scalloped gene encodes a novel, evolutionarily conserved transcription factor required for sensory organ differentiation in *Drosophila*. *Genes Dev* **6**: 367-379.
- Carvalho J, Bertram PG, Wentz SR & Zheng XF (2001)** Phosphorylation regulates the interaction between Gln3p and the nuclear import factor Srp1p. *J Biol Chem* **276**: 25359-25365.
- Catimel B, Teh T, Fontes MR, et al. (2001)** Biophysical characterization of interactions involving importin- α during nuclear import. *J Biol Chem* **276**: 34189-34198.
- Chan CK, Hubner S, Hu W & Jans DA (1998)** Mutual exclusivity of DNA binding and nuclear localization signal recognition by the yeast transcription factor GAL4: implications for nonviral DNA delivery. *Gene Ther* **5**: 1204-1212.
- Chen H, Cheng H & Bjerknes M (1993)** One-step Coomassie brilliant blue R-250 staining of proteins in polyacrylamide gel. *Anal Biochem* **212**: 295-296.
- Chen MH, Ben-Efraim I, Mitrousis G, Walker-Kopp N, Sims PJ & Cingolani G (2005)** Phospholipid scramblase 1 contains a nonclassical nuclear localization signal with unique binding site in importin α . *J Biol Chem* **280**: 10599-10606.
- Choi KY, Satterberg B, Lyons DM & Elion EA (1994)** Ste5 tethers multiple protein kinases in the MAP kinase cascade required for mating in *S. cerevisiae*. *Cell* **78**: 499-512.
- Choi KY, Kranz JE, Mahanty SK, Park KS & Elion EA (1999)** Characterization of Fus3 localization: active Fus3 localizes in complexes of varying size and specific activity. *Mol Biol Cell* **10**: 1553-1568.
- Chook YM & Blobel G (1999)** Structure of the nuclear transport complex karyopherin- β 2-Ran x GppNHp. *Nature* **399**: 230-237.
- Chook YM & Blobel G (2001)** Karyopherins and nuclear import. *Curr Opin Struct Biol* **11**: 703-715.
- Chook YM, Jung A, Rosen MK & Blobel G (2002)** Uncoupling Kap β 2 substrate dissociation and ran binding. *Biochemistry* **41**: 6955-6966.
- Chou S, Lane S & Liu H (2006)** Regulation of mating and filamentation genes by two distinct Ste12 complexes in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Cell Biol* **26**: 4794-4805.
- Cingolani G, Petosa C, Weis K & Müller CW (1999)** Structure of importin- β bound to the IBB domain of importin- α . *Nature* **399**: 221-229.
- Cingolani G, Bednenko J, Gillespie MT & Gerace L (2002)** Molecular basis for the recognition of a nonclassical nuclear localization signal by importin β . *Mol Cell* **10**: 1345-1353.

- Clement M, Deshaies F, de Repentigny L & Belhumeur P (2006)** The nuclear GTPase Gsp1p can affect proper telomeric function through the Sir4 protein in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Microbiol* **62**: 453-468.
- Cokol M, Nair R & Rost B (2000)** Finding nuclear localization signals. *EMBO Rep* **1**: 411-415.
- Conti E & Kuriyan J (2000)** Crystallographic analysis of the specific yet versatile recognition of distinct nuclear localization signals by karyopherin alpha. *Structure* **8**: 329-338.
- Conti E & Izaurralde E (2001)** Nucleocytoplasmic transport enters the atomic age. *Curr Opin Cell Biol* **13**: 310-319.
- Conti E, Müller CW & Stewart M (2006)** Karyopherin flexibility in nucleocytoplasmic transport. *Curr Opin Struct Biol* **16**: 237-244.
- Conti E, Uy M, Leighton L, Blobel G & Kuriyan J (1998)** Crystallographic analysis of the recognition of a nuclear localization signal by the nuclear import factor karyopherin alpha. *Cell* **94**: 193-204.
- Cook A, Bono F, Jinek M & Conti E (2007)** Structural biology of nucleocytoplasmic transport. *Annu Rev Biochem* **76**: 647-671.
- Cook JG, Bardwell L & Thorner J (1997)** Inhibitory and activating functions for MAPK Kss1 in the *S. cerevisiae* filamentous-growth signalling pathway. *Nature* **390**: 85-88.
- Cook JG, Bardwell L, Kron SJ & Thorner J (1996)** Two novel targets of the MAP kinase Kss1 are negative regulators of invasive growth in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Genes Dev* **10**: 2831-2848.
- Cremer T, Cremer M, Dietzel S, Muller S, Solovei I & Fakan S (2006)** Chromosome territories-a functional nuclear landscape. *Curr Opin Cell Biol* **18**: 307-316.
- Cullen PJ & Sprague GF, Jr. (2000)** Glucose depletion causes haploid invasive growth in yeast. *Proc Natl Acad Sci USA* **97**: 13619-13624.
- Cullen PJ, Sabbagh W, Jr., Graham E, et al. (2004)** A signaling mucin at the head of the Cdc42- and MAPK-dependent filamentous growth pathway in yeast. *Genes Dev* **18**: 1695-1708.
- Cunningham BC & Wells JA (1989)** High-resolution epitope mapping of hGH-receptor interactions by alanine-scanning mutagenesis. *Science* **244**: 1081-1085.
- Dahl E, Kristiansen G, Gottlob K, et al. (2006)** Molecular profiling of laser-microdissected matched tumor and normal breast tissue identifies karyopherin alpha2 as a potential novel prognostic marker in breast cancer. *Clin Cancer Res* **12**: 3950-3960.
- Daneholt B (1997)** A look at messenger RNP moving through the nuclear pore. *Cell* **88**: 585-588.
- De Vit MJ, Waddle JA & Johnston M (1997)** Regulated nuclear translocation of the Mig1 glucose repressor. *Mol Biol Cell* **8**: 1603-1618.
- Delahodde A, Pandjaitan R, Corral-Debrinski M & Jacq C (2001)** Pse1/Kap121-dependent nuclear localization of the major yeast multidrug resistance (MDR) transcription factor Pdr1. *Mol Microbiol* **39**: 304-312.
- DeLano W (2002)** The PyMOL molecular graphics system. *DeLano Scientific LLC, San Carlos, CA*.
- Deshpande N, Chopra A, Rangarajan A, Shashidhara LS, Rodrigues V & Krishna S (1997)** The human transcription enhancer factor-1, TEF-1, can substitute for Drosophila scalloped during wingblade development. *J Biol Chem* **272**: 10664-10668.
- DeVit MJ & Johnston M (1999)** The nuclear exportin Msn5 is required for nuclear export of the Mig1 glucose repressor of *Saccharomyces cerevisiae*. *Curr Biol* **9**: 1231-1241.

- Dingwall C, Sharnick SV & Laskey RA (1982)** A polypeptide domain that specifies migration of nucleoplasmin into the nucleus. *Cell* **30**: 449-458.
- Drabig A (2007)** Identifizierung potentieller Kernlokalisierungssequenzen des Transkriptionsfaktors Tec1p aus *Saccharomyces cerevisiae*. *Bachelorarbeit*.
- Enenkel C, Blobel G & Rexach M (1995)** Identification of a yeast karyopherin heterodimer that targets import substrate to mammalian nuclear pore complexes. *J Biol Chem* **270**: 16499-16502.
- Englmeier L, Olivo JC & Mattaj IW (1999)** Receptor-mediated substrate translocation through the nuclear pore complex without nucleotide triphosphate hydrolysis. *Curr Biol* **9**: 30-41.
- Esposito MS & Klapholz S (1981)** Meiosis and ascospore development. In: *The Molecular Biology of the Yeast Saccharomyces: Life Cycle and Inheritance*. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y. 211-287.
- Fanara P, Hodel MR, Corbett AH & Hodel AE (2000)** Quantitative analysis of nuclear localization signal (NLS)-importin alpha interaction through fluorescence depolarization. Evidence for auto-inhibitory regulation of NLS binding. *J Biol Chem* **275**: 21218-21223.
- Farrance IK & Ordahl CP (1996)** The role of transcription enhancer factor-1 (TEF-1) related proteins in the formation of M-CAT binding complexes in muscle and non-muscle tissues. *J Biol Chem* **271**: 8266-8274.
- Farrance IK, Mar JH & Ordahl CP (1992)** M-CAT binding factor is related to the SV40 enhancer binding factor, TEF-1. *J Biol Chem* **267**: 17234-17240.
- Fasken MB & Corbett AH (2009)** Mechanisms of nuclear mRNA quality control. *RNA Biol* **6**: 237-241.
- Ferrigno P, Posas F, Koepp D, Saito H & Silver PA (1998)** Regulated nucleo/cytoplasmic exchange of *HOG1* MAPK requires the importin beta homologs *NMD5* and *XPO1*. *EMBO J* **17**: 5606-5614.
- Fischer U, Huber J, Boelens WC, Mattaj IW & Lührmann R (1995)** The HIV-1 Rev activation domain is a nuclear export signal that accesses an export pathway used by specific cellular RNAs. *Cell* **82**: 475-483.
- Fontes MR, Teh T & Kobe B (2000)** Structural basis of recognition of monopartite and bipartite nuclear localization sequences by mammalian importin-alpha. *J Mol Biol* **297**: 1183-1194.
- Frech M, Darden TA, Pedersen LG, Foley CK, Charifson PS, Anderson MW & Wittinghofer A (1994)** Role of glutamine-61 in the hydrolysis of GTP by p21H-ras: an experimental and theoretical study. *Biochemistry* **33**: 3237-3244.
- Freedman ND & Yamamoto KR (2004)** Importin 7 and importin alpha/importin beta are nuclear import receptors for the glucocorticoid receptor. *Mol Biol Cell* **15**: 2276-2286.
- Freifelder D (1960)** Bud position in *Saccharomyces cerevisiae*. *J Bacteriol* **80**: 567-568.
- Frey S & Görlich D (2009)** FG/FxFG as well as GLFG repeats form a selective permeability barrier with self-healing properties. *EMBO J* **28**: 2554-2567.
- Fridell RA, Truant R, Thorne L, Benson RE & Cullen BR (1997)** Nuclear import of hnRNP A1 is mediated by a novel cellular cofactor related to karyopherin-beta. *J Cell Sci* **110** (Pt 11): 1325-1331.
- Fries T, Betz C, Sohn K, Caesar S, Schlenstedt G & Bailer SM (2007)** A novel conserved nuclear localization signal is recognized by a group of yeast importins. *J Biol Chem* **282**: 19292-19301.

- Galy V, Gadal O, Fromont-Racine M, Romano A, Jacquier A & Nehrbass U (2004)** Nuclear retention of unspliced mRNAs in yeast is mediated by perinuclear Mlp1. *Cell* **116**: 63-73.
- Gancedo JM (2001)** Control of pseudohyphae formation in *Saccharomyces cerevisiae*. *FEMS Microbiol Rev* **25**: 107-123.
- Gavin AC, Aloy P, Grandi P, et al. (2006)** Proteome survey reveals modularity of the yeast cell machinery. *Nature* **440**: 631-636.
- Gavrias V, Andrianopoulos A, Gimeno CJ & Timberlake WE (1996)** *Saccharomyces cerevisiae* *TEC1* is required for pseudohyphal growth. *Mol Microbiol* **19**: 1255-1263.
- Ghaemmaghami S, Huh WK, Bower K, et al. (2003)** Global analysis of protein expression in yeast. *Nature* **425**: 737-741.
- Gimeno CJ, Ljungdahl PO, Styles CA & Fink GR (1992)** Unipolar cell divisions in the yeast *S. cerevisiae* lead to filamentous growth: regulation by starvation and *RAS*. *Cell* **68**: 1077-1090.
- Goldberg MW & Allen TD (1992)** High resolution scanning electron microscopy of the nuclear envelope: demonstration of a new, regular, fibrous lattice attached to the baskets of the nucleoplasmic face of the nuclear pores. *J Cell Biol* **119**: 1429-1440.
- Goldfarb DS, Corbett AH, Mason DA, Harreman MT & Adam SA (2004)** Importin alpha: a multipurpose nuclear-transport receptor. *Trends Cell Biol* **14**: 505-514.
- Görlich D & Mattaj IW (1996)** Nucleocytoplasmic transport. *Science* **271**: 1513-1518.
- Görlich D & Kutay U (1999)** Transport between the cell nucleus and the cytoplasm. *Annu Rev Cell Dev Biol* **15**: 607-660.
- Görlich D, Henklein P, Laskey RA & Hartmann E (1996)** A 41 amino acid motif in importin-alpha confers binding to importin-beta and hence transit into the nucleus. *EMBO J* **15**: 1810-1817.
- Görlich D, Kostka S, Kraft R, Dingwall C, Laskey RA, Hartmann E & Prehn S (1995)** Two different subunits of importin cooperate to recognize nuclear localization signals and bind them to the nuclear envelope. *Curr Biol* **5**: 383-392.
- Görlich D, Dabrowski M, Bischoff FR, et al. (1997)** A novel class of RanGTP binding proteins. *J Cell Biol* **138**: 65-80.
- Greiner M, Caesar S & Schlenstedt G (2004)** The histones H2A/H2B and H3/H4 are imported into the yeast nucleus by different mechanisms. *Eur J Cell Biol* **83**: 511-520.
- Grosshans H, Deinert K, Hurt E & Simos G (2001)** Biogenesis of the signal recognition particle (SRP) involves import of SRP proteins into the nucleolus, assembly with the SRP-RNA, and Xpo1p-mediated export. *J Cell Biol* **153**: 745-762.
- Grundt K, Haga IV, Huitfeldt HS & Ostvold AC (2007)** Identification and characterization of two putative nuclear localization signals (NLS) in the DNA-binding protein NUCKS. *Biochim Biophys Acta* **1773**: 1398-1406.
- Gruss OJ, Carazo-Salas RE, Schatz CA, et al. (2001)** Ran induces spindle assembly by reversing the inhibitory effect of importin alpha on TPX2 activity. *Cell* **104**: 83-93.
- Guss KA, Nelson CE, Hudson A, Kraus ME & Carroll SB (2001)** Control of a genetic regulatory network by a selector gene. *Science* **292**: 1164-1167.
- Gwizdek C, Ossareh-Nazari B, Brownawell AM, Evers S, Macara IG & Dargemont C (2004)** Minihelix-containing RNAs mediate exportin-5-dependent nuclear export of the double-stranded RNA-binding protein ILF3. *J Biol Chem* **279**: 884-891.
- Hahn S, Maurer P, Caesar S & Schlenstedt G (2008)** Classical NLS proteins from *Saccharomyces cerevisiae*. *J Mol Biol* **379**: 678-694.

- Halder G, Polaczyk P, Kraus ME, Hudson A, Kim J, Laughon A & Carroll S (1998)** The Vestigial and Scalloped proteins act together to directly regulate wing-specific gene expression in *Drosophila*. *Genes Dev* **12**: 3900-3909.
- Hall MN, Hereford L & Herskowitz I (1984)** Targeting of *E. coli* beta-galactosidase to the nucleus in yeast. *Cell* **36**: 1057-1065.
- Hall MN, Craik C & Hiraoka Y (1990)** Homeodomain of yeast repressor alpha 2 contains a nuclear localization signal. *Proc Natl Acad Sci USA* **87**: 6954-6958.
- Harel A, Chan RC, Lachish-Zalait A, Zimmerman E, Elbaum M & Forbes DJ (2003)** Importin beta negatively regulates nuclear membrane fusion and nuclear pore complex assembly. *Mol Biol Cell* **14**: 4387-4396.
- Harreman MT, Hodel MR, Fanara P, Hodel AE & Corbett AH (2003)** The auto-inhibitory function of importin alpha is essential in vivo. *J Biol Chem* **278**: 5854-5863.
- Harreman MT, Cohen PE, Hodel MR, Truscott GJ, Corbett AH & Hodel AE (2003)** Characterization of the auto-inhibitory sequence within the N-terminal domain of importin alpha. *J Biol Chem* **278**: 21361-21369.
- Hartnett J, Gracyalny BS & Slater MR (2006)** The Single Step (KRX) Competent Cells: Efficient Cloning and High Protein Yields. *Promega Notes* **94**: 27-30.
- Hartwell LH (1974)** *Saccharomyces cerevisiae* cell cycle. *Bacteriol Rev* **38**: 164-198.
- Heise B, van der Felden J, Kern S, Malcher M, Brückner S & Mösch HU (2010)** The TEA transcription factor Tec1 confers promoter-specific gene regulation by Ste12-dependent and -independent mechanisms. *Eukaryot Cell* **9**: 514-531.
- Heitman J, Movva NR & Hall MN (1991)** Targets for cell cycle arrest by the immunosuppressant rapamycin in yeast. *Science* **253**: 905-909.
- Hellmuth K, Lau DM, Bischoff FR, Künzler M, Hurt E & Simos G (1998)** Yeast Los1p has properties of an exportin-like nucleocytoplasmic transport factor for tRNA. *Mol Cell Biol* **18**: 6374-6386.
- Hieda M, Tachibana T, Yokoya F, Kose S, Imamoto N & Yoneda Y (1999)** A monoclonal antibody to the COOH-terminal acidic portion of Ran inhibits both the recycling of Ran and nuclear protein import in living cells. *J Cell Biol* **144**: 645-655.
- Hinshaw JE & Milligan RA (2003)** Nuclear pore complexes exceeding eightfold rotational symmetry. *J Struct Biol* **141**: 259-268.
- Ho Y, Gruhler A, Heilbut A, et al. (2002)** Systematic identification of protein complexes in *Saccharomyces cerevisiae* by mass spectrometry. *Nature* **415**: 180-183.
- Hodel AE, Harreman MT, Pulliam KF, et al. (2006)** Nuclear localization signal receptor affinity correlates with in vivo localization in *Saccharomyces cerevisiae*. *J Biol Chem* **281**: 23545-23556.
- Hodges JL, Leslie JH, Mosammaparast N, Guo Y, Shabanowitz J, Hunt DF & Pemberton LF (2005)** Nuclear import of TFIIB is mediated by Kap114p, a karyopherin with multiple cargo-binding domains. *Mol Biol Cell* **16**: 3200-3210.
- Hoffman CS & Winston F (1987)** A ten-minute DNA preparation from yeast efficiently releases autonomous plasmids for transformation of *Escherichia coli*. *Gene* **57**: 267-272.
- Hood JK & Silver PA (1999)** In or out? Regulating nuclear transport. *Curr Opin Cell Biol* **11**: 241-247.
- Hsu DK, Guo Y, Alberts GF, et al. (1996)** Identification of a murine TEF-1-related gene expressed after mitogenic stimulation of quiescent fibroblasts and during myogenic differentiation. *J Biol Chem* **271**: 13786-13795.
- Huxford T, Huang DB, Malek S & Ghosh G (1998)** The crystal structure of the I κ B α /NF- κ B complex reveals mechanisms of NF- κ B inactivation. *Cell* **95**: 759-770.

- Hwang JJ, Chambon P & Davidson I (1993)** Characterization of the transcription activation function and the DNA binding domain of transcriptional enhancer factor-1. *EMBO J* **12**: 2337-2348.
- Isgro TA & Schulten K (2005)** Binding dynamics of isolated nucleoporin repeat regions to importin-beta. *Structure* **13**: 1869-1879.
- Isoyama T, Kuge S & Nomoto A (2002)** The core protein of hepatitis C virus is imported into the nucleus by transport receptor Kap123p but inhibits Kap121p-dependent nuclear import of yeast AP1-like transcription factor in yeast cells. *J Biol Chem* **277**: 39634-39641.
- Ito H, Fukuda Y, Murata K & Kimura A (1983)** Transformation of intact yeast cells treated with alkali cations. *J Bacteriol* **153**: 163-168.
- Iwase M & Toh-e A (2001)** Nis1 encoded by YNL078W: a new neck protein of *Saccharomyces cerevisiae*. *Genes Genet Syst* **76**: 335-343.
- Izaurrealde E & Adam S (1998)** Transport of macromolecules between the nucleus and the cytoplasm. *RNA* **4**: 351-364.
- Jacobs MD & Harrison SC (1998)** Structure of an IkappaBalpha/NF-kappaB complex. *Cell* **95**: 749-758.
- Jain AK, Bloom DA & Jaiswal AK (2005)** Nuclear import and export signals in control of Nrf2. *J Biol Chem* **280**: 29158-29168.
- Jäkel S & Görlich D (1998)** Importin beta, transportin, RanBP5 and RanBP7 mediate nuclear import of ribosomal proteins in mammalian cells. *EMBO J* **17**: 4491-4502.
- Jäkel S, Mingot JM, Schwarzmaier P, Hartmann E & Görlich D (2002)** Importins fulfil a dual function as nuclear import receptors and cytoplasmic chaperones for exposed basic domains. *EMBO J* **21**: 377-386.
- Jäkel S, Albig W, Kutay U, Bischoff FR, Schwamborn K, Doenecke D & Görlich D (1999)** The importin beta/importin 7 heterodimer is a functional nuclear import receptor for histone H1. *EMBO J* **18**: 2411-2423.
- Jaquenoud M, van Drogen F & Peter M (2002)** Cell cycle-dependent nuclear export of Cdh1p may contribute to the inactivation of APC/C(Cdh1). *EMBO J* **21**: 6515-6526.
- Jensen TH, Neville M, Rain JC, McCarthy T, Legrain P & Rosbash M (2000)** Identification of novel *Saccharomyces cerevisiae* proteins with nuclear export activity: cell cycle-regulated transcription factor ace2p shows cell cycle-independent nucleocytoplasmic shuttling. *Mol Cell Biol* **20**: 8047-8058.
- Jiang SW, Wu K & Eberhardt NL (1999)** Human placental TEF-5 transactivates the human chorionic somatomammotropin gene enhancer. *Mol Endocrinol* **13**: 879-889.
- Johnson AW, Lund E & Dahlberg J (2002)** Nuclear export of ribosomal subunits. *Trends Biochem Sci* **27**: 580-585.
- Johnson ES, Ma PC, Ota IM & Varshavsky A (1995)** A proteolytic pathway that recognizes ubiquitin as a degradation signal. *J Biol Chem* **270**: 17442-17456.
- Kaffman A, Rank NM & O'Shea EK (1998)** Phosphorylation regulates association of the transcription factor Pho4 with its import receptor Pse1/Kap121. *Genes Dev* **12**: 2673-2683.
- Kaganovich D, Kopito R & Frydman J (2008)** Misfolded proteins partition between two distinct quality control compartments. *Nature* **454**: 1088-1095.
- Kalderon D, Richardson WD, Markham AF & Smith AE (1984)** Sequence requirements for nuclear location of simian virus 40 large-T antigen. *Nature* **311**: 33-38.
- Kalderon D, Roberts BL, Richardson WD & Smith AE (1984)** A short amino acid sequence able to specify nuclear location. *Cell* **39**: 499-509.
- Kiefer F, Arnold K, Kunzli M, Bordoli L & Schwede T (2009)** The SWISS-MODEL Repository and associated resources. *Nucleic Acids Res* **37**: D387-392.

- Kim KY, Truman AW, Caesar S, Schlenstedt G & Levin DE (2010)** Yeast Mpk1 cell wall integrity mitogen-activated protein kinase regulates nucleocytoplasmic shuttling of the Swi6 transcriptional regulator. *Mol Biol Cell* **21**: 1609-1619.
- Kiseleva E, Goldberg MW, Allen TD & Akey CW (1998)** Active nuclear pore complexes in *Chironomus*: visualization of transporter configurations related to mRNP export. *J Cell Sci* **111** (Pt 2): 223-236.
- Klebe C, Bischoff FR, Ponstingl H & Wittinghofer A (1995)** Interaction of the nuclear GTP-binding protein Ran with its regulatory proteins *RCC1* and *RanGAP1*. *Biochemistry* **34**: 639-647.
- Kobe B (1999)** Autoinhibition by an internal nuclear localization signal revealed by the crystal structure of mammalian importin alpha. *Nat Struct Biol* **6**: 388-397.
- Koepp DM, Wong DH, Corbett AH & Silver PA (1996)** Dynamic localization of the nuclear import receptor and its interactions with transport factors. *J Cell Biol* **133**: 1163-1176.
- Köhler T, Wesche S, Taheri N, Braus GH & Mösch HU (2002)** Dual role of the *Saccharomyces cerevisiae* TEA/ATTS family transcription factor Tec1p in regulation of gene expression and cellular development. *Eukaryot Cell* **1**: 673-686.
- Komeili A & O'Shea EK (1999)** Roles of phosphorylation sites in regulating activity of the transcription factor Pho4. *Science* **284**: 977-980.
- Koshland DE (1958)** Application of a Theory of Enzyme Specificity to Protein Synthesis. *Proc Natl Acad Sci USA* **44**: 98-104.
- Kron SJ, Styles CA & Fink GR (1994)** Symmetric cell division in pseudohyphae of the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Biol Cell* **5**: 1003-1022.
- Künzler M & Hurt EC (1998)** Cse1p functions as the nuclear export receptor for importin alpha in yeast. *FEBS Lett* **433**: 185-190.
- Kupiec M, Byers B, Esposito RE & Mitchell AP (1997)** Meiosis and sporulation in *Saccharomyces cerevisiae*. In: *The Molecular Biology of the Yeast Saccharomyces*. Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, N.Y. 889-1036.
- Kushnirov VV (2000)** Rapid and reliable protein extraction from yeast. *Yeast* **16**: 857-860.
- Kutay U, Bischoff FR, Kostka S, Kraft R & Görlich D (1997)** Export of importin alpha from the nucleus is mediated by a specific nuclear transport factor. *Cell* **90**: 1061-1071.
- Kutay U, Hartmann E, Treichel N, et al. (2000)** Identification of two novel RanGTP-binding proteins belonging to the importin beta superfamily. *J Biol Chem* **275**: 40163-40168.
- la Cour T, Gupta R, Rapacki K, Skriver K, Poulsen FM & Brunak S (2003)** NESbase version 1.0: a database of nuclear export signals. *Nucleic Acids Res* **31**: 393-396.
- LaCasse EC & Lefebvre YA (1995)** Nuclear localization signals overlap DNA- or RNA-binding domains in nucleic acid-binding proteins. *Nucleic Acids Res* **23**: 1647-1656.
- Laemmli UK (1970)** Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* **227**: 680-685.
- Lai MC, Lin RI, Huang SY, Tsai CW & Tarn WY (2000)** A human importin-beta family protein, transportin-SR2, interacts with the phosphorylated RS domain of SR proteins. *J Biol Chem* **275**: 7950-7957.
- Laloux I, Dubois E, Dewerchin M & Jacobs E (1990)** *TEC1*, a gene involved in the activation of Ty1 and Ty1-mediated gene expression in *Saccharomyces cerevisiae*: cloning and molecular analysis. *Mol Cell Biol* **10**: 3541-3550.

- Lam MH, Briggs LJ, Hu W, Martin TJ, Gillespie MT & Jans DA (1999)** Importin beta recognizes parathyroid hormone-related protein with high affinity and mediates its nuclear import in the absence of importin alpha. *J Biol Chem* **274**: 7391-7398.
- Lanford RE & Butel JS (1984)** Construction and characterization of an SV40 mutant defective in nuclear transport of T antigen. *Cell* **37**: 801-813.
- Lanford RE, Kanda P & Kennedy RC (1986)** Induction of nuclear transport with a synthetic peptide homologous to the SV40 T antigen transport signal. *Cell* **46**: 575-582.
- Lange A, Mills RE, Devine SE & Corbett AH (2008)** A PY-NLS nuclear targeting signal is required for nuclear localization and function of the *Saccharomyces cerevisiae* mRNA-binding protein Hrp1. *J Biol Chem* **283**: 12926-12934.
- Lange A, McLane LM, Mills RE, Devine SE & Corbett AH (2010)** Expanding the definition of the classical bipartite nuclear localization signal. *Traffic* **11**: 311-323.
- Lange A, Mills RE, Lange CJ, Stewart M, Devine SE & Corbett AH (2007)** Classical nuclear localization signals: definition, function, and interaction with importin alpha. *J Biol Chem* **282**: 5101-5105.
- Lau D, Künzler M, Braunwarth A, Hellmuth K, Podtelejnikov A, Mann M & Hurt E (2000)** Purification of protein A-tagged yeast ran reveals association with a novel karyopherin beta family member, Pdr6p. *J Biol Chem* **275**: 467-471.
- Leclerc P, Jibard N, Meng X, et al. (1998)** Quantification of the nucleocytoplasmic distribution of wild type and modified proteins using confocal microscopy: interaction between 90-kDa heat shock protein (Hsp90 alpha) and glucocorticosteroid receptor (GR). *Exp Cell Res* **242**: 255-264.
- Lee BJ, Cansizoglu AE, Süel KE, Louis TH, Zhang Z & Chook YM (2006)** Rules for nuclear localization sequence recognition by karyopherin beta 2. *Cell* **126**: 543-558.
- Lee DC & Aitchison JD (1999)** Kap104p-mediated nuclear import. Nuclear localization signals in mRNA-binding proteins and the role of Ran and Rna. *J Biol Chem* **274**: 29031-29037.
- Lee SJ, Sekimoto T, Yamashita E, et al. (2003)** The structure of importin-beta bound to SREBP-2: nuclear import of a transcription factor. *Science* **302**: 1571-1575.
- Lehmann A, Janek K, Braun B, Kloetzel PM & Enenkel C (2002)** 20 S proteasomes are imported as precursor complexes into the nucleus of yeast. *J Mol Biol* **317**: 401-413.
- Lengeler KB, Davidson RC, D'Souza C, et al. (2000)** Signal transduction cascades regulating fungal development and virulence. *Microbiol Mol Biol Rev* **64**: 746-785.
- Leslie DM, Grill B, Rout MP, Wozniak RW & Aitchison JD (2002)** Kap121p-mediated nuclear import is required for mating and cellular differentiation in yeast. *Mol Cell Biol* **22**: 2544-2555.
- Leslie DM, Zhang W, Timney BL, Chait BT, Rout MP, Wozniak RW & Aitchison JD (2004)** Characterization of karyopherin cargoes reveals unique mechanisms of Kap121p-mediated nuclear import. *Mol Cell Biol* **24**: 8487-8503.
- Li PP, Nakanishi A, Shum D, et al. (2001)** Simian virus 40 Vp1 DNA-binding domain is functionally separable from the overlapping nuclear localization signal and is required for effective virion formation and full viability. *J Virol* **75**: 7321-7329.
- Lin W, Ye W, Cai L, et al. (2009)** The roles of multiple importins for nuclear import of murine aristaless-related homeobox protein. *J Biol Chem* **284**: 20428-20439.
- Liu H, Styles CA & Fink GR (1993)** Elements of the yeast pheromone response pathway required for filamentous growth of diploids. *Science* **262**: 1741-1744.
- Liu SM & Stewart M (2005)** Structural basis for the high-affinity binding of nucleoporin Nup1p to the *Saccharomyces cerevisiae* importin-beta homologue, Kap95p. *J Mol Biol* **349**: 515-525.
- Lo HJ, Köhler JR, DiDomenico B, Loebenberg D, Cacciapuoti A & Fink GR (1997)** Nonfilamentous *C. albicans* mutants are avirulent. *Cell* **90**: 939-949.

- Lorenz MC & Heitman J (1998)** Regulators of pseudohyphal differentiation in *Saccharomyces cerevisiae* identified through multicopy suppressor analysis in ammonium permease mutant strains. *Genetics* **150**: 1443-1457.
- Lorenz MC, Cutler NS & Heitman J (2000)** Characterization of alcohol-induced filamentous growth in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Biol Cell* **11**: 183-199.
- Lund E, Guttinger S, Calado A, Dahlberg JE & Kutay U (2004)** Nuclear export of microRNA precursors. *Science* **303**: 95-98.
- Ma D, Cook JG & Thorner J (1995)** Phosphorylation and localization of Kss1, a MAP kinase of the *Saccharomyces cerevisiae* pheromone response pathway. *Mol Biol Cell* **6**: 889-909.
- Macara IG (2001)** Transport into and out of the nucleus. *Microbiol Mol Biol Rev* **65**: 570-594, table of contents.
- Madhani HD & Fink GR (1997)** Combinatorial control required for the specificity of yeast MAPK signaling. *Science* **275**: 1314-1317.
- Madhani HD, Styles CA & Fink GR (1997)** MAP kinases with distinct inhibitory functions impart signaling specificity during yeast differentiation. *Cell* **91**: 673-684.
- Madrid AS & Weis K (2006)** Nuclear transport is becoming crystal clear. *Chromosoma* **115**: 98-109.
- Makhnevych T, Lusk CP, Anderson AM, Aitchison JD & Wozniak RW (2003)** Cell cycle regulated transport controlled by alterations in the nuclear pore complex. *Cell* **115**: 813-823.
- Malik HS, Eickbush TH & Goldfarb DS (1997)** Evolutionary specialization of the nuclear targeting apparatus. *Proc Natl Acad Sci USA* **94**: 13738-13742.
- Mandel M & Higa A (1970)** Calcium-dependent bacteriophage DNA infection. *J Mol Biol* **53**: 159-162.
- Mar JH & Ordahl CP (1990)** M-CAT binding factor, a novel trans-acting factor governing muscle-specific transcription. *Mol Cell Biol* **10**: 4271-4283.
- Matheny C, Day ML & Milbrandt J (1994)** The nuclear localization signal of NGFI-A is located within the zinc finger DNA binding domain. *J Biol Chem* **269**: 8176-8181.
- Maurer P, Redd M, Solsbacher J, et al. (2001)** The nuclear export receptor Xpo1p forms distinct complexes with NES transport substrates and the yeast Ran binding protein 1 (Yrb1p). *Mol Biol Cell* **12**: 539-549.
- Melen K, Fagerlund R, Franke J, Köhler M, Kinnunen L & Julkunen I (2003)** Importin alpha nuclear localization signal binding sites for STAT1, STAT2, and influenza A virus nucleoprotein. *J Biol Chem* **278**: 28193-28200.
- Milewski RC, Chi NC, Li J, Brown C, Lu MM & Epstein JA (2004)** Identification of minimal enhancer elements sufficient for Pax3 expression in neural crest and implication of Tead2 as a regulator of Pax3. *Development* **131**: 829-837.
- Mingot JM, Kostka S, Kraft R, Hartmann E & Görlich D (2001)** Importin 13: a novel mediator of nuclear import and export. *EMBO J* **20**: 3685-3694.
- Mirabito PM, Adams TH & Timberlake WE (1989)** Interactions of three sequentially expressed genes control temporal and spatial specificity in *Aspergillus* development. *Cell* **57**: 859-868.
- Mitchell AP (1998)** Dimorphism and virulence in *Candida albicans*. *Curr Opin Microbiol* **1**: 687-692.
- Miyauchi Y, Michigami T, Sakaguchi N, et al. (2005)** Importin 4 is responsible for ligand-independent nuclear translocation of vitamin D receptor. *J Biol Chem* **280**: 40901-40908.
- Mohr D, Frey S, Fischer T, Guttler T & Görlich D (2009)** Characterisation of the passive permeability barrier of nuclear pore complexes. *EMBO J* **28**: 2541-2553.

- Moll T, Tebb G, Surana U, Robitsch H & Nasmyth K (1991)** The role of phosphorylation and the CDC28 protein kinase in cell cycle-regulated nuclear import of the *S. cerevisiae* transcription factor SWI5. *Cell* **66**: 743-758.
- Moore MS & Blobel G (1993)** The GTP-binding protein Ran/TC4 is required for protein import into the nucleus. *Nature* **365**: 661-663.
- Moroianu J, Blobel G & Radu A (1995)** Previously identified protein of uncertain function is karyopherin alpha and together with karyopherin beta docks import substrate at nuclear pore complexes. *Proc Natl Acad Sci USA* **92**: 2008-2011.
- Mosammaparast N & Pemberton LF (2004)** Karyopherins: from nuclear-transport mediators to nuclear-function regulators. *Trends Cell Biol* **14**: 547-556.
- Mosammaparast N, Guo Y, Shabanowitz J, Hunt DF & Pemberton LF (2002)** Pathways mediating the nuclear import of histones H3 and H4 in yeast. *J Biol Chem* **277**: 862-868.
- Mosammaparast N, Jackson KR, Guo Y, Brame CJ, Shabanowitz J, Hunt DF & Pemberton LF (2001)** Nuclear import of histone H2A and H2B is mediated by a network of karyopherins. *J Cell Biol* **153**: 251-262.
- Mösch H-U, Roberts RL & Fink GR (1996)** Ras2 signals via the Cdc42/Ste20/mitogen-activated protein kinase module to induce filamentous growth in *Saccharomyces cerevisiae*. *Proc Natl Acad Sci USA* **93**: 5352-5356.
- Mühlhäusser P, Müller EC, Otto A & Kutay U (2001)** Multiple pathways contribute to nuclear import of core histones. *EMBO Rep* **2**: 690-696.
- Mullis K, Faloona F, Scharf S, Saiki R, Horn G & Erlich H (1986)** Specific enzymatic amplification of DNA in vitro: the polymerase chain reaction. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol* **51 Pt 1**: 263-273.
- Nachury MV & Weis K (1999)** The direction of transport through the nuclear pore can be inverted. *Proc Natl Acad Sci USA* **96**: 9622-9627.
- Nachury MV, Maresca TJ, Salmon WC, Waterman-Storer CM, Heald R & Weis K (2001)** Importin beta is a mitotic target of the small GTPase Ran in spindle assembly. *Cell* **104**: 95-106.
- Nagai S, Dubrana K, Tsai-Pflugfelder M, et al. (2008)** Functional targeting of DNA damage to a nuclear pore-associated SUMO-dependent ubiquitin ligase. *Science* **322**: 597-602.
- Nagoshi E, Imamoto N, Sato R & Yoneda Y (1999)** Nuclear import of sterol regulatory element-binding protein-2, a basic helix-loop-helix-leucine zipper (bHLH-Zip)-containing transcription factor, occurs through the direct interaction of importin beta with HLH-Zip. *Mol Biol Cell* **10**: 2221-2233.
- Nasmyth K, Adolf G, Lydall D & Seddon A (1990)** The identification of a second cell cycle control on the HO promoter in yeast: cell cycle regulation of SW15 nuclear entry. *Cell* **62**: 631-647.
- Nemergut ME & Macara IG (2000)** Nuclear import of the ran exchange factor, *RCC1*, is mediated by at least two distinct mechanisms. *J Cell Biol* **149**: 835-850.
- Nemergut ME, Mizzen CA, Stukenberg T, Allis CD & Macara IG (2001)** Chromatin docking and exchange activity enhancement of *RCC1* by histones H2A and H2B. *Science* **292**: 1540-1543.
- Nguyen Ba AN, Pogoutse A, Provart N & Moses AM (2009)** NLStradamus: a simple Hidden Markov Model for nuclear localization signal prediction. *BMC Bioinformatics* **10**: 202.
- Noguchi E, Saitoh Y, Sazer S & Nishimoto T (1999)** Disruption of the YRB2 gene retards nuclear protein export, causing a profound mitotic delay, and can be rescued by overexpression of XPO1/CRM1. *J Biochem* **125**: 574-585.

- Ohtsubo M, Okazaki H & Nishimoto T (1989)** The RCC1 protein, a regulator for the onset of chromosome condensation locates in the nucleus and binds to DNA. *J Cell Biol* **109**: 1389-1397.
- Palecek SP, Parikh AS & Kron SJ (2002)** Sensing, signalling and integrating physical processes during *Saccharomyces cerevisiae* invasive and filamentous growth. *Microbiology* **148**: 893-907.
- Palmeri D & Malim MH (1999)** Importin beta can mediate the nuclear import of an arginine-rich nuclear localization signal in the absence of importin alpha. *Mol Cell Biol* **19**: 1218-1225.
- Pante N & Kann M (2002)** Nuclear pore complex is able to transport macromolecules with diameters of about 39 nm. *Mol Biol Cell* **13**: 425-434.
- Paraskeva E, Izaurralde E, Bischoff FR, et al. (1999)** CRM1-mediated recycling of snurportin 1 to the cytoplasm. *J Cell Biol* **145**: 255-264.
- Paschal BM & Gerace L (1995)** Identification of NTF2, a cytosolic factor for nuclear import that interacts with nuclear pore complex protein p62. *J Cell Biol* **129**: 925-937.
- Peifer M, Berg S & Reynolds AB (1994)** A repeating amino acid motif shared by proteins with diverse cellular roles. *Cell* **76**: 789-791.
- Pemberton LF & Paschal BM (2005)** Mechanisms of receptor-mediated nuclear import and nuclear export. *Traffic* **6**: 187-198.
- Pemberton LF, Rosenblum JS & Blobel G (1997)** A distinct and parallel pathway for the nuclear import of an mRNA-binding protein. *J Cell Biol* **139**: 1645-1653.
- Pemberton LF, Blobel G & Rosenblum JS (1998)** Transport routes through the nuclear pore complex. *Curr Opin Cell Biol* **10**: 392-399.
- Pemberton LF, Rosenblum JS & Blobel G (1999)** Nuclear import of the TATA-binding protein: mediation by the karyopherin Kap114p and a possible mechanism for intranuclear targeting. *J Cell Biol* **145**: 1407-1417.
- Picard D & Yamamoto KR (1987)** Two signals mediate hormone-dependent nuclear localization of the glucocorticoid receptor. *EMBO J* **6**: 3333-3340.
- Plafker SM & Macara IG (2000)** Importin-11, a nuclear import receptor for the ubiquitin-conjugating enzyme, UbcM2. *EMBO J* **19**: 5502-5513.
- Plafker SM, Plafker KS, Weissman AM & Macara IG (2004)** Ubiquitin charging of human class III ubiquitin-conjugating enzymes triggers their nuclear import. *J Cell Biol* **167**: 649-659.
- Polizotto RS & Cyert MS (2001)** Calcineurin-dependent nuclear import of the transcription factor Crz1p requires Nmd5p. *J Cell Biol* **154**: 951-960.
- Pollard VW, Michael WM, Nakielny S, Siomi MC, Wang F & Dreyfuss G (1996)** A novel receptor-mediated nuclear protein import pathway. *Cell* **86**: 985-994.
- Poon IK & Jans DA (2005)** Regulation of nuclear transport: central role in development and transformation? *Traffic* **6**: 173-186.
- Pries R, Bömeke K, Irniger S, Grundmann O & Braus GH (2002)** Amino acid-dependent Gcn4p stability regulation occurs exclusively in the yeast nucleus. *Eukaryot Cell* **1**: 663-672.
- Pries R, Bömeke K, Draht O, Künzler M & Braus GH (2004)** Nuclear import of yeast Gcn4p requires karyopherins Srp1p and Kap95p. *Mol Genet Genomics* **271**: 257-266.
- Quan X, Rassadi R, Rabie B, Matusiewicz N & Stochaj U (2004)** Regulated nuclear accumulation of the yeast hsp70 Ssa4p in ethanol-stressed cells is mediated by the N-terminal domain, requires the nuclear carrier Nmd5p and protein kinase C. *Faseb J* **18**: 899-901.

- Quan X, Tsoulos P, Kuritzky A, Zhang R & Stochaj U (2006)** The carrier Msn5p/Kap142p promotes nuclear export of the hsp70 Ssa4p and relocates in response to stress. *Mol Microbiol* **62**: 592-609.
- Quan Y, Ji ZL, Wang X, Tartakoff AM & Tao T (2008)** Evolutionary and transcriptional analysis of karyopherin beta superfamily proteins. *Mol Cell Proteomics* **7**: 1254-1269.
- Queralt E & Igual JC (2003)** Cell cycle activation of the Swi6p transcription factor is linked to nucleocytoplasmic shuttling. *Mol Cell Biol* **23**: 3126-3140.
- Radu A, Moore MS & Blobel G (1995)** The peptide repeat domain of nucleoporin Nup98 functions as a docking site in transport across the nuclear pore complex. *Cell* **81**: 215-222.
- Rasband WS (1997)** ImageJ. *U.S. National Institutes of Health, Bethesda, Maryland, USA*; <http://imagej.nih.gov/ij/>, 1997-2011.
- Reichelt R, Holzenburg A, Buhle EL, Jr., Jarnik M, Engel A & Aebi U (1990)** Correlation between structure and mass distribution of the nuclear pore complex and of distinct pore complex components. *J Cell Biol* **110**: 883-894.
- Renicke C (2010)** Erweiterung eines Systems zur gezielten Proteindestabilisierung durch Degronaktivierung mittels Tabak-Ätz-Virus-Protease in *Saccharomyces cerevisiae*. *Masterarbeit*.
- Rexach M & Blobel G (1995)** Protein import into nuclei: association and dissociation reactions involving transport substrate, transport factors, and nucleoporins. *Cell* **83**: 683-692.
- Ribbeck K & Görlich D (2001)** Kinetic analysis of translocation through nuclear pore complexes. *EMBO J* **20**: 1320-1330.
- Ribbeck K, Kutay U, Paraskeva E & Görlich D (1999)** The translocation of transportin-cargo complexes through nuclear pores is independent of both Ran and energy. *Curr Biol* **9**: 47-50.
- Ribbeck K, Lipowsky G, Kent HM, Stewart M & Görlich D (1998)** NTF2 mediates nuclear import of Ran. *EMBO J* **17**: 6587-6598.
- Richards SA, Carey KL & Macara IG (1997)** Requirement of guanosine triphosphate-bound ran for signal-mediated nuclear protein export. *Science* **276**: 1842-1844.
- Robbins J, Dilworth SM, Laskey RA & Dingwall C (1991)** Two interdependent basic domains in nucleoplasmin nuclear targeting sequence: identification of a class of bipartite nuclear targeting sequence. *Cell* **64**: 615-623.
- Roberts RL & Fink GR (1994)** Elements of a single MAP kinase cascade in *Saccharomyces cerevisiae* mediate two developmental programs in the same cell type: mating and invasive growth. *Genes Dev* **8**: 2974-2985.
- Robzyk K & Kassir Y (1992)** A simple and highly efficient procedure for rescuing autonomous plasmids from yeast. *Nucleic Acids Res* **20**: 3790.
- Rose M & Botstein D (1983)** Construction and use of gene fusions to *lacZ* (β -galactosidase) that are expressed in yeast. *Methods Enzymol* **101**: 167-180.
- Rosenblum JS, Pemberton LF & Blobel G (1997)** A nuclear import pathway for a protein involved in tRNA maturation. *J Cell Biol* **139**: 1655-1661.
- Rosenblum JS, Pemberton LF, Bonifaci N & Blobel G (1998)** Nuclear import and the evolution of a multifunctional RNA-binding protein. *J Cell Biol* **143**: 887-899.
- Rost B, Yachdav G & Liu J (2004)** The PredictProtein server. *Nucleic Acids Res* **32**: W321-326.
- Rout MP & Blobel G (1993)** Isolation of the yeast nuclear pore complex. *J Cell Biol* **123**: 771-783.

- Rout MP, Blobel G & Aitchison JD (1997)** A distinct nuclear import pathway used by ribosomal proteins. *Cell* **89**: 715-725.
- Rout MP, Aitchison JD, Suprapto A, Hjertaas K, Zhao Y & Chait BT (2000)** The yeast nuclear pore complex: composition, architecture, and transport mechanism. *J Cell Biol* **148**: 635-651.
- Sabbagh W, Jr., Flatauer LJ, Bardwell AJ & Bardwell L (2001)** Specificity of MAP kinase signaling in yeast differentiation involves transient versus sustained MAPK activation. *Mol Cell* **8**: 683-691.
- Saiki RK, Scharf S, Faloona F, Mullis KB, Horn GT, Erlich HA & Arnheim N (1985)** Enzymatic amplification of beta-globin genomic sequences and restriction site analysis for diagnosis of sickle cell anemia. *Science* **230**: 1350-1354.
- Sambrook J, Fritsch E & Maniatis T (1989)** Molecular cloning. A Laboratory Manual. Plainview, N.Y.: Cold Spring Harbor Laboratory Press.
- Savory JG, Hsu B, Laquian IR, Giffin W, Reich T, Hache RJ & Lefebvre YA (1999)** Discrimination between NL1- and NL2-mediated nuclear localization of the glucocorticoid receptor. *Mol Cell Biol* **19**: 1025-1037.
- Schaper S, Franke J, Meijsing SH & Ehrenhofer-Murray AE (2005)** Nuclear import of the histone acetyltransferase complex SAS-I in *Saccharomyces cerevisiae*. *J Cell Sci* **118**: 1473-1484.
- Scheffzek K, Klebe C, Fritz-Wolf K, Kabsch W & Wittinghofer A (1995)** Crystal structure of the nuclear Ras-related protein Ran in its GDP-bound form. *Nature* **374**: 378-381.
- Schlenstedt G, Smirnova E, Deane R, et al. (1997)** Yrb4p, a yeast ran-GTP-binding protein involved in import of ribosomal protein L25 into the nucleus. *EMBO J* **16**: 6237-6249.
- Schmidt-Zachmann MS & Nigg EA (1993)** Protein localization to the nucleolus: a search for targeting domains in nucleolin. *J Cell Sci* **105** (Pt 3): 799-806.
- Schweizer A, Rupp S, Taylor BN, Rölinghoff M & Schröppel K (2000)** The TEA/ATTS transcription factor CaTec1p regulates hyphal development and virulence in *Candida albicans*. *Mol Microbiol* **38**: 435-445.
- Schwoebel ED, Talcott B, Cushman I & Moore MS (1998)** Ran-dependent signal-mediated nuclear import does not require GTP hydrolysis by Ran. *J Biol Chem* **273**: 35170-35175.
- Seedorf M & Silver PA (1997)** Importin/karyopherin protein family members required for mRNA export from the nucleus. *Proc Natl Acad Sci USA* **94**: 8590-8595.
- Senger B, Simos G, Bischoff FR, Podtelejnikov A, Mann M & Hurt E (1998)** Mtr10p functions as a nuclear import receptor for the mRNA-binding protein Npl3p. *EMBO J* **17**: 2196-2207.
- Sheff MA & Thorn KS (2004)** Optimized cassettes for fluorescent protein tagging in *Saccharomyces cerevisiae*. *Yeast* **21**: 661-670.
- Shepherd MG (1988)** Morphogenetic transformation of fungi. *Curr Top Med Mycol* **2**: 278-304.
- Sherman F, Fink GR & Hicks J (1986)** *Methods in yeast genetics*. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY.
- Shock TR, Thompson J, Yates JR 3rd & Madhani HD (2009)** Hog1 mitogen-activated protein kinase (MAPK) interrupts signal transduction between the Kss1 MAPK and the Tec1 transcription factor to maintain pathway specificity. *Eukaryot Cell* **8**: 606-616.
- Shostak Y & Yamamoto KR (2005)** Overlapping but separable determinants of DNA binding and nuclear localization map to the C-terminal end of the *Caenorhabditis elegans* DAF-12 DNA binding domain. *J Biol Chem* **280**: 6554-6560.

- Shulga N, Roberts P, Gu Z, Spitz L, Tabb MM, Nomura M & Goldfarb DS (1996)** In vivo nuclear transport kinetics in *Saccharomyces cerevisiae*: a role for heat shock protein 70 during targeting and translocation. *J Cell Biol* **135**: 329-339.
- Sidorova JM, Mikesell GE & Breeden LL (1995)** Cell cycle-regulated phosphorylation of Swi6 controls its nuclear localization. *Mol Biol Cell* **6**: 1641-1658.
- Smith A, Brownawell A & Macara IG (1998)** Nuclear import of Ran is mediated by the transport factor NTF2. *Curr Biol* **8**: 1403-1406.
- Solsbacher J, Maurer P, Bischoff FR & Schlenstedt G (1998)** Cse1p is involved in export of yeast importin alpha from the nucleus. *Mol Cell Biol* **18**: 6805-6815.
- Sorokin AV, Kim ER & Ovchinnikov LP (2007)** Nucleocytoplasmic transport of proteins. *Biochemistry (Mosc)* **72**: 1439-1457.
- Srivastava A, MacKay JO & Bell JB (2002)** A Vestigial:Scalloped TEA domain chimera rescues the wing phenotype of a scalloped mutation in *Drosophila melanogaster*. *Genesis* **33**: 40-47.
- Steggerda SM & Paschal BM (2002)** Regulation of nuclear import and export by the GTPase Ran. *Int Rev Cytol* **217**: 41-91.
- Stewart AF, Larkin SB, Farrance IK, Mar JH, Hall DE & Ordahl CP (1994)** Muscle-enriched TEF-1 isoforms bind M-CAT elements from muscle-specific promoters and differentially activate transcription. *J Biol Chem* **269**: 3147-3150.
- Stoffler D, Feja B, Fahrenkrog B, Walz J, Typke D & Aebl U (2003)** Cryo-electron tomography provides novel insights into nuclear pore architecture: implications for nucleocytoplasmic transport. *J Mol Biol* **328**: 119-130.
- Ström AC & Weis K (2001)** Importin-beta-like nuclear transport receptors. *Genome Biol* **2**: 3008.3001-3008.3009.
- Süel KE & Chook YM (2009)** Kap104p imports the PY-NLS-containing transcription factor Tfg2p into the nucleus. *J Biol Chem* **284**: 15416-15424.
- Süel KE, Gu H & Chook YM (2008)** Modular organization and combinatorial energetics of proline-tyrosine nuclear localization signals. *PLoS Biol* **6**: e137.
- Taddei A (2007)** Active genes at the nuclear pore complex. *Curr Opin Cell Biol* **19**: 305-310.
- Takizawa CG, Weis K & Morgan DO (1999)** Ran-independent nuclear import of cyclin B1-Cdc2 by importin beta. *Proc Natl Acad Sci USA* **96**: 7938-7943.
- Tao T, Lan J, Lukacs GL, Hache RJ & Kaplan F (2006)** Importin 13 regulates nuclear import of the glucocorticoid receptor in airway epithelial cells. *Am J Respir Cell Mol Biol* **35**: 668-680.
- Taxis C, Stier G, Spadaccini R & Knop M (2009)** Efficient protein depletion by genetically controlled deprotection of a dormant N-degron. *Mol Syst Biol* **5**: 267.
- Tedford K, Kim S, Sa D, Stevens K & Tyers M (1997)** Regulation of the mating pheromone and invasive growth responses in yeast by two MAP kinase substrates. *Curr Biol* **7**: 228-238.
- Terry LJ, Shows EB & Wente SR (2007)** Crossing the nuclear envelope: hierarchical regulation of nucleocytoplasmic transport. *Science* **318**: 1412-1416.
- Tesfaigzi J, Smith-Harrison W & Carlson DM (1994)** A simple method for reusing western blots on PVDF membranes. *Biotechniques* **17**: 268-269.
- Theodore M, Kawai Y, Yang J, Kleshchenko Y, Reddy SP, Villalta F & Arinze IJ (2008)** Multiple nuclear localization signals function in the nuclear import of the transcription factor Nrf2. *J Biol Chem* **283**: 8984-8994.
- Titov AA & Blobel G (1999)** The karyopherin Kap122p/Pdr6p imports both subunits of the transcription factor IIA into the nucleus. *J Cell Biol* **147**: 235-246.

- Towbin H, Staehelin T & Gordon J (1979)** Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. *Proc Natl Acad Sci USA* **76**: 4350-4354.
- Truant R & Cullen BR (1999)** The arginine-rich domains present in human immunodeficiency virus type 1 Tat and Rev function as direct importin beta-dependent nuclear localization signals. *Mol Cell Biol* **19**: 1210-1217.
- Truant R, Fridell RA, Benson RE, Bogerd H & Cullen BR (1998)** Identification and functional characterization of a novel nuclear localization signal present in the yeast Nab2 poly(A)+ RNA binding protein. *Mol Cell Biol* **18**: 1449-1458.
- Ueta R, Fukunaka A & Yamaguchi-Iwai Y (2003)** Pse1p mediates the nuclear import of the iron-responsive transcription factor Aft1p in *Saccharomyces cerevisiae*. *J Biol Chem* **278**: 50120-50127.
- van der Felden J (2008)** Die Rolle der Tec1-Ste12-Heterodimerbildung bei der Transkriptionskontrolle in *Saccharomyces cerevisiae*. *Diplomarbeit*.
- Varagona MJ & Raikhel NV (1994)** The basic domain in the bZIP regulatory protein Opaque2 serves two independent functions: DNA binding and nuclear localization. *Plant J* **5**: 207-214.
- Vetter IR, Arndt A, Kutay U, Görlich D & Wittinghofer A (1999)** Structural view of the Ran-Importin beta interaction at 2.3 Å resolution. *Cell* **97**: 635-646.
- Walther TC, Askjaer P, Gentzel M, et al. (2003)** RanGTP mediates nuclear pore complex assembly. *Nature* **424**: 689-694.
- Warner JR (1990)** The nucleolus and ribosome formation. *Curr Opin Cell Biol* **2**: 521-527.
- Weiner MP, Costa GL, Schoettlin W, Cline J, Mathur E & Bauer JC (1994)** Site-directed mutagenesis of double-stranded DNA by the polymerase chain reaction. *Gene* **151**: 119-123.
- Weis K, Ryder U & Lamond AI (1996)** The conserved amino-terminal domain of hSRP1 alpha is essential for nuclear protein import. *EMBO J* **15**: 1818-1825.
- Wellmann A, Flemming P, Behrens P, et al. (2001)** High expression of the proliferation and apoptosis associated CSE1L/CAS gene in hepatitis and liver neoplasms: correlation with tumor progression. *Int J Mol Med* **7**: 489-494.
- Wen W, Meinkoth JL, Tsien RY & Taylor SS (1995)** Identification of a signal for rapid export of proteins from the nucleus. *Cell* **82**: 463-473.
- Wesche, S. (2000)** Die Rolle des Transkriptionsfaktors Tec1p bei der Regulation des invasiven Wachstums in *Saccharomyces cerevisiae*. *Diplomarbeit*
- Wiese C, Wilde A, Moore MS, Adam SA, Merdes A & Zheng Y (2001)** Role of importin-beta in coupling Ran to downstream targets in microtubule assembly. *Science* **291**: 653-656.
- Winnepenninckx V, Lazar V, Michiels S, et al. (2006)** Gene expression profiling of primary cutaneous melanoma and clinical outcome. *J Natl Cancer Inst* **98**: 472-482.
- Wittkowski K (2009)** Charakterisierung der Kernlokalisierung des Transkriptionsfaktors Tec1 aus *Saccharomyces cerevisiae*. *Masterarbeit*.
- Wolberger C, Pabo CO, Vershon AK & Johnson AD (1991)** Crystallization and preliminary X-ray diffraction studies of a MAT alpha 2-DNA complex. *J Mol Biol* **217**: 11-13.
- Wolberger C, Vershon AK, Liu B, Johnson AD & Pabo CO (1991)** Crystal structure of a MAT alpha 2 homeodomain-operator complex suggests a general model for homeodomain-DNA interactions. *Cell* **67**: 517-528.
- Wozniak RW, Rout MP & Aitchison JD (1998)** Karyopherins and kissing cousins. *Trends Cell Biol* **8**: 184-188.

- Wu J, Duggan A & Chalfie M (2001)** Inhibition of touch cell fate by egl-44 and egl-46 in *C. elegans*. *Genes Dev* **15**: 789-802.
- Wunderlich J (2008)** Die Rolle der TEA-DNA-Bindedomäne des Transkriptionsfaktors Tec1 beim Kerntransport in *Saccharomyces cerevisiae*. *Bachelorarbeit*.
- Xia Z, Webster A, Du F, Piatkov K, Ghislain M & Varshavsky A (2008)** Substrate-binding sites of UBR1, the ubiquitin ligase of the N-end rule pathway. *J Biol Chem* **283**: 24011-24028.
- Xiao JH, Davidson I, Matthes H, Garnier JM & Chambon P (1991)** Cloning, expression, and transcriptional properties of the human enhancer factor TEF-1. *Cell* **65**: 551-568.
- Yaffe MP & Schatz G (1984)** Two nuclear mutations that block mitochondrial protein import in yeast. *Proc Natl Acad Sci USA* **81**: 4819-4823.
- Yamaguchi R & Newport J (2003)** A role for Ran-GTP and Crm1 in blocking re-replication. *Cell* **113**: 115-125.
- Yan C, Lee LH & Davis LI (1998)** Crm1p mediates regulated nuclear export of a yeast AP-1-like transcription factor. *EMBO J* **17**: 7416-7429.
- Yang CH, Lambie EJ, Hardin J, Craft J & Snyder M (1989)** Higher order structure is present in the yeast nucleus: autoantibody probes demonstrate that the nucleolus lies opposite the spindle pole body. *Chromosoma* **98**: 123-128.
- Yang Q, Rout MP & Akey CW (1998)** Three-dimensional architecture of the isolated yeast nuclear pore complex: functional and evolutionary implications. *Mol Cell* **1**: 223-234.
- Yoshida K & Blobel G (2001)** The karyopherin Kap142p/Msn5p mediates nuclear import and nuclear export of different cargo proteins. *J Cell Biol* **152**: 729-740.
- Zaman S, Lippman SI, Zhao X & Broach JR (2008)** How *Saccharomyces* responds to nutrients. *Annu Rev Genet* **42**: 27-81.
- Zandi E, Tran TN, Chamberlain W & Parker CS (1997)** Nuclear entry, oligomerization, and DNA binding of the *Drosophila* heat shock transcription factor are regulated by a unique nuclear localization sequence. *Genes Dev* **11**: 1299-1314.
- Zenklusen D, Vinciguerra P, Strahm Y & Stutz F (2001)** The yeast hnRNP-Like proteins Yra1p and Yra2p participate in mRNA export through interaction with Mex67p. *Mol Cell Biol* **21**: 4219-4232.
- Zhu J, Qiu Z, Wiese C, Ishii Y, Friedrichsen J, Rajashekara G & Splitter GA (2005)** Nuclear and mitochondrial localization signals overlap within bovine herpesvirus 1 tegument protein VP22. *J Biol Chem* **280**: 16038-16044.

7. Abkürzungen

Für Maßeinheiten wurde das Internationale Einheitensystem (SI; *Système international d'unités*) und die davon abgeleiteten Einheiten verwendet. Die Aminosäuren wurden mit dem Ein-Buchstaben-Code der Nomenklatur der „International Union of Biochemistry and Molecular Biology“ abgekürzt (<http://www.chem.qmul.ac.uk/iupac/AminoAcid/>).

2-dG	2-Desoxyglukose	N/C-Relation	nukleozytoplasmatische Relation
Abb.	Abbildung	NatNT2	Nourseothricin-Resistenz
Ac	Azetat	NES	nuclear export signal, Kernexportsignal
AD	Aktivierungsdomäne	NLS	nuclear localization signal, Kernlokalisierungssignal
APS	Ammoniumsulfat	NMR	nuclear magnetic resonance, Kernspinresonanz
AS	Aminosäure	nNLS	novel NLS
BD	Bindedomäne	NPC	nuclear pore complex, Kernporenkomplex
bla	β -Lactamase	N-terminal	amino-terminal
bp	Basenpaare	NTP	Nukleosidtriphosphat
BSA	bovine serum albumin	Nups	Nukleoporeine
C	Zytoplasma	OD	Optische Dichte
cNLS	klassische NLS	P	Promotor
C-terminal	carboxy-terminal	PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
Da	Maßeinheit „Dalton“	PCR	polymerase chain reaction
dH ₂ O	destilliertes Wasser	PEG	Polyethylenglykol
DIC	differential interference contrast	P _i	anorganisches Phosphat
DNA	Desoxyribonukleinsäure	PMSF	Phenylmethylsulfonylfluorid
DTT	Dithiothreitol	Poly-dIdC	Poly(deoxyinosinic- deoxycytidylic) acid sodium salt
EDTA	Ethylendiamintetraacetat	PRE	pheromone responsive element
EMSA	Elektrophoretischer Mobilitätsshift Assay	RanBP	Ran-Bindeprotein
FRAP	fluorescence recovery after photobleaching	RFP	rot fluoreszierendes Protein
FRE	filamentation response element	RNA	Ribonukleinsäure
GAP	GTPase-aktivierendes Protein	rpm	Rotationen pro Minute
GDP	Guanosindiphosphat	SDS	sodium dodecyl sulfate (Natriumlaurylsulfat)
GEF	Guaninnukleotid- Austauschfaktor	t	Terminator
GFP	grün fluoreszierendes Protein	TBS	Tris buffered saline
GSH	Glutathion	TCS	TEA consensus sequence
GST	Glutathion-S-Transferase	TE	Tris-EDTA
GTP	Guanosintriphosphat	TEAD	TEF-1, Tec1 und AbaA-Domäne (TEA-Domäne)
H	Helix	TEMED	N,N,N',N'-Tetramethyldiamin
HA	Hämagglutinin	TIPI	TEV-Protease induzierte Protein Inhibierung
HEPES	2-(4-(2-Hydroxyethyl)-1- piperazinyl)-ethansulfonsäure	Tween	Polyoxyethylensorbitan- monolaurate
IBB-Domäne	Importin β -Bindedomäne	v/v	volume per volume
Imp	Importin	w/v	weight per volume
IPTG	Isopropyl- β -D- Thiogalactopyranosid	WT	Wildtyp
JUNQ	juxtannuclear quality control	x g	Erdbeschleunigung
Kap	Karyopherin	yeGFP	yeast enhanced GFP
L	Loop	YEPD	yeast extract peptone dextrose
MAPK	Mitogen-aktivierte Protein Kinase	YEPG	yeast extract peptone galactose
MBP	Maltose Bindeprotein		
MOPS	3-(N-Morpholino)- Propansulfonsäure		
N	Nukleus		
n. d.	nicht determiniert		

8. Danksagung

Ich bedanke mich ganz herzlich bei:

... meinem Doktorvater Prof. Dr. Hans-Ulrich Mösch für das zu mir und meinem Nachnamen (☺) passende Thema meiner Doktorarbeit, für die zahlreichen Tipps und Hilfestellungen, aufmunternde Worte, ein offenes Ohr für alle Fragen und Probleme und gelegentliches Aufsammeln an der Bushaltestelle.

... Herrn Prof. Dr. Uwe Maier für das Verfassen des Zweitgutachtens.

... bei Frau Prof. Dr. Susanne Önel und Herrn Prof. Dr. Michael Bölker für die Bereitschaft, meiner Prüfungskommission anzugehören.

... meinem „Advisory Board“ während der Doktorarbeit, Herr Prof. Dr. Michael Bölker, Frau Prof. Dr. Andrea Maisner und Frau Prof. Dr. Renate Renkawitz-Pohl für gute Ratschläge und kritische Fragen zu meiner Arbeit.

... dem DFG-Graduiertenkolleg 1216 „Intra- and intercellular transport and communication“ für die Finanzierung und besonders Herrn Prof. Dr. Maier und Frau Lucette Claudet für die gute Organisation des GK's.

... Dr. Stefan Brückner für viele gute Ratschläge, Hilfestellungen, kritische Blicke, die meistens friedliche Ko-Existenz im Labor und dem indirekten Beitrag zu meinem persönlichen Wachstum.

... Dr. Christof Taxis für die detaillierte Einführung in die Welt der Fluoreszenzmikroskopie und besonders die Hilfe bei der Durchführung der FRAP-Experimente, sowie die ausführliche Beantwortung verschiedener Fragen.

... Hanne Steinebach für organisatorische Tätigkeiten verschiedener Art.

... allen Mitgliedern der AG Mösch und AG Bölker für die angenehme Arbeitsatmosphäre, nette Gespräche, Tipps und Tricks, sowie viele schöne gemeinsame Abende.

... Didi für die Durchführung mancher ungeliebter Routinearbeiten.

... Prof. Dr. Anita Corbett für die Überlassung des Nop1-GFP-Plasmids.

... Dr. Susanne M. Bailer für die Überlassung der Kap-GST Plasmide.

... Christian Renicke für die unermüdliche Hilfe bei der Erstellung des Pdf-Dokuments.

... Bettina, Sonja, Julia & Flo für viele schöne Freizeitunternehmungen und aufmunternde Worte.

... Gudrun, Silke, Susanne und Sonja für viele schöne gemeinsame Stunden.

... last but not least meinen Eltern, meiner Schwester und Oma dafür, dass sie immer für mich da sind und mich bei allem unterstützen.

9. Erklärung

Ich versichere, dass ich meine Dissertation mit dem Titel „Kernimport des TEAD-Transkriptionsfaktors Tec1 aus *Saccharomyces cerevisiae*“ unter der Leitung von Herrn Prof. Dr. H.-U. Mösch selbständig und ohne unerlaubte Hilfe angefertigt habe und mich dabei keiner anderen als der von mir ausdrücklich angegebenen Quellen und Hilfen bedient habe. Die Dissertation wurde in der jetzigen oder einer ähnlichen Form noch bei keiner anderen Hochschule eingereicht und hat noch keinen sonstigen Prüfungszwecken gedient.

(Ort, Datum)

(Sandra Kern)

10. Lebenslauf

Persönliche Daten

Geburtsdatum	19.05.1982
Geburtsort	Kassel

Schulausbildung

1992 – 2001	Goetheschule in Kassel (Gymnasium) Schulabschluss: Abitur
-------------	---

Studium

2001 – 2006	Studium an der Philipps-Universität Marburg Diplomstudiengang Biologie Abschluss: Diplom
-------------	---

Promotion

2007 – 2011	Promotion an der Philipps-Universität Marburg im Fachgebiet Genetik, bei Prof. H.-U. Mösch
-------------	---